



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DOCTORADO EN BIOCENCIAS MOLECULARES

TESIS DOCTORAL

**Implicación de las mutaciones N370S y L444P en el gen
GBA1 en la desregulación de la homeostasis celular y su
relación con la enfermedad de Parkinson**

Lorena Orgaz Gordillo

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Implicación de las mutaciones N370S y L444P en el gen
GBA1 en la desregulación de la homeostasis celular y su
relación con la enfermedad de Parkinson**

Memoria presentada por **Lorena Orgaz Gordillo**, licenciada en Biología,
para optar al título de Doctor, elaborada bajo la dirección de
la Dra. Rosario Moratalla Villalba y la Dra. Patricia Julia García Sanz,
en el Instituto Cajal (CSIC), Madrid



Dra. ROSARIO MORATALLA VILLALBA, Profesor de Investigación en el Instituto Cajal, y Dra. PATRICIA JULIA GARCÍA SANZ, Investigador en el Instituto Cajal

CERTIFICAN

Que Doña Lorena Orgaz Gordillo ha realizado en el departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas del Instituto Cajal (CSIC), bajo nuestra dirección, la presente Tesis Doctoral “Implicación de las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA1* en la desregulación de la homeostasis celular y su relación con la enfermedad de Parkinson”.

Fdo: Rosario Moratalla Villalba

Fdo: Patricia Julia García Sanz

“El investigador sufre las decepciones, los largos meses pasados en una dirección equivocada, los fracasos.

Pero los fracasos son también útiles, porque, bien analizados, pueden conducir al éxito. Y para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea...”

Sir Alexander Fleming

AGRADECIMIENTOS

Hay muchas personas a las que deseo agradecerle su apoyo, tanto laboral como personal, personas que han estado desde el comienzo de esta aventura o que han aparecido a lo largo de los años y me han ayudado cada una a su manera.

En primer lugar, quisiera agradecerle a una de mis co-directoras de tesis, la Dra. Rosario Moratalla, por confiar en mí desde el principio. Le agradezco que me diera la oportunidad de entrar en su laboratorio hace 7 años, y por ofrecerme la posibilidad de realizar esta tesis y formarme como investigadora, por poner a nuestro alcance numerosos recursos muy valiosos facilitando mi desarrollo y aprendizaje. A mi otra co-directora, la Dra. Patricia García. Todo lo que se es gracias a ella. Me ha enseñado muchísimo, tanto a nivel laboral como personal y siempre será para mí un referente y ejemplo de trabajo. Sin lugar a duda, ha sido un auténtico placer trabajar codo con codo con ella.

Por supuesto, quiero agradecerles a todas las personas que forman o en algún momento han formado parte del B-01. Me llevo algo de todas y cada de ellas, todas me han enseñado algo y me han ayudado siempre que lo he necesitado. Son como una familia para mí.

Uno de los mayores agradecimientos es para mis padres, gracias a ellos he conseguido llegar hasta aquí. Ellos han puesto los medios, haciendo un gran esfuerzo, para que pudiera dedicarme a lo que me gustaba. Gracias. No me olvido de mi hermano, que siempre ha aguantado mis historias frikis científicas. Ni de mi primo David, quien tiene parte de culpa de que a mí me guste este mundillo. Siempre ha estado ahí para asesorarme y darme ánimos. Pero sin duda, mi mayor apoyo moral, especialmente los últimos meses, ha sido Jaime, mi “mejor compañero de vida”. Él siempre me ha dado fuerzas y ánimos cuando ya no me quedaban, ha aguantado mis llantos, bajones y cambios de humor... Gracias por tantas cosas y por apoyarme en todo.

Finalmente, quiero darles las gracias a todos mis amigos de Aranjuez (Tania y Marga, y a los trambólicos jaja) y a mis brujitas biolocas. Siempre escuchando mis problemas e intentando sacarme una sonrisa.

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente después de la enfermedad de Alzheimer. Se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y pérdida de la dopamina responsable del control motor. La degeneración dopaminérgica se asocia a la aparición de cuerpos de Lewy, agregados proteicos que contienen alfa-sinucleína (α -Syn), ubiquitina y p62/SQSTM1, principalmente. Hoy en día se sabe que la EP es el resultado de la interacción de múltiples factores como la edad, condiciones ambientales y factores genéticos. Uno de los principales factores de riesgo lo constituyen las mutaciones en el gen *GBA1*, que codifica la enzima lisosomal β -glucocerebrosidasa-1 (GCase1) encargada de degradar el glicolípido glucocerebrósido en glucosa y ceramida, aunque se desconocen los mecanismos moleculares que predisponen a la neurodegeneración. Con el objetivo de comprender estos mecanismos, en esta tesis hemos empleado un modelo celular paciente-específico de la EP, utilizando fibroblastos de pacientes portadores de las mutaciones N370S o L444P en heterocigosis en el gen *GBA1*.

Hemos demostrado que ambas mutaciones en *GBA1* producen un cambio de la localización subcelular de la GCase1, quedando parcialmente retenida en el retículo endoplásmico (RE). Esta retención genera estrés del RE, activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (vía UPR) y una desorganización estructural tanto del RE como del aparato de Golgi. Como consecuencia de esto, disminuye la cantidad y la actividad de GCase1 en los lisosomas produciendo acumulación de colesterol lisosomal y generación de cuerpos multilamelares. La aparición de estas estructuras está asociada con una disfunción lisosomal (acumulación de lisosomas y disminución de la actividad enzimática) favoreciendo una autofagia ineficaz (aumento de p62/SQSTM1 y variación del número de autofagosomas). Esta autofagia conlleva una eliminación anormal de mitocondrias y como consecuencia un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, incrementando así la vulnerabilidad y la muerte celular. En resumen, todas estas alteraciones de la homeostasis celular puede ser una de las causas por las que las neuronas dopaminérgicas están degenerando en los enfermos de Parkinson con estas mutaciones.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disease after Alzheimer's disease. It is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra and the loss of dopamine responsible for motor control. Dopaminergic degeneration is associated with the appearance of Lewy bodies, protein aggregates that contain mainly alpha-synuclein (α -Syn), ubiquitin and p62/SQSTM1. Nowadays, it is known that PD is the result of the interactions of multiple factors such as age, environmental conditions and genetic factors. One of the main risk factors is mutations in the *GBA1* gene, which encodes the lysosomal enzyme β -glucocerebrosidase-1 (GCase1). This protein is responsible for degrading glycolipid glucocerebroside in glucose and ceramide, although the molecular mechanisms that predispose to neurodegeneration are unknown. In order to understand these mechanisms, in this thesis we have used a patient-specific cellular model of PD, using fibroblasts from patients carrying the N370S or L444P mutations in heterozygosis in the *GBA1* gene.

We have proved that both mutations in *GBA1* produce a change in the subcellular localization of GCase1, being partially retained in the endoplasmic reticulum (ER). This retention generates ER stress, activation of the response to misfolded proteins (UPR pathway) and a structural disorganization of both the ER and the Golgi apparatus. As a consequence of this, the levels and activity of GCase1 in the lysosomes decreases producing lysosomal cholesterol accumulation and lamellar body generation. The appearance of these structures is associated with a lysosomal dysfunction (accumulation of lysosomes and decreased enzyme activity) favoring an ineffective autophagy (increase in p62 / SQSTM1 and variation in the number of autophagosomes). This autophagy leads to an abnormal elimination of mitochondria and therefore, an increase in the production of reactive oxygen species, which produce and increment of vulnerability and cell death. In summary, all these alterations of cellular homeostasis may be one of the causes of why dopaminergic neurons are degenerating in Parkinson's patients with these mutations.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	19
INTRODUCCIÓN	21
1. La enfermedad de Parkinson	23
1.1. Factores genéticos asociados a la enfermedad de Parkinson	25
2. <i>GBA1</i> y la enfermedad de Parkinson.....	26
2.1. Características de la β -glucocerebrosidasa-1	26
2.2. Conexión entre la enfermedad de Parkinson y mutaciones en el gen <i>GBA1</i>	28
2.3. Alteración de la homeostasis celular causada por mutaciones en <i>GBA1</i>	31
2.3.1. Estrés del retículo endoplásmico	31
2.3.2. Defectos en la vía de la autofagia y alteraciones lisosomales.....	33
2.3.3. Alteraciones mitocondriales	37
2.3.3.1. Estrés oxidativo.....	37
2.3.3.2. Estructura y dinámica mitocondrial.....	39
OBJETIVOS.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. Fibroblastos derivados de pacientes, cultivo y tratamientos	47
1.1. Obtención de fibroblastos humanos	47
1.2. Cultivo y mantenimiento de los fibroblastos humanos	49
2. Extracción de ADN y secuenciación.....	49
3. Western blot	49
4. Tratamiento con endoglicosidasa-H	50
5. Inmunocitoquímica	51
6. RT-PCR cuantitativa	52
7. Tinciones celulares.....	52
7.1. LysoTracker®/Filipin III	52
7.2. Cytopainter	53
8. Actividad enzimas lisosomales	53
9. Estrés oxidativo y viabilidad	54
9.1. Especies reactivas de oxígeno.....	54
9.2. Apoptosis	55
10. Lentivirus	56

10.1. Plásmidos	56
10.2. Producción de lentivirus	56
10.3. Titulación	57
10.4. Selección de los fibroblastos LC3B-GFP positivos (<i>sorting</i>)	57
11. Análisis de la estructura de la red mitocondrial	58
12. Análisis de las imágenes de fluorescencia	58
12.1. Intensidad de la señal de fluorescencia	58
12.2. Colocalización	59
12.3. Morfología de la red mitocondrial	59
13. Microscopía electrónica.....	59
14. Análisis estadístico.....	60
RESULTADOS.....	61
1. Las mutaciones N370S y L444P en heterocigosis del gen <i>GBA1</i> disminuyen la expresión de GCasa1 sin alterar la transcripción	63
2. Las mutaciones en <i>GBA1</i> aumentan la retención de la GCasa1 en el retículo endoplásmico	64
3. Los fibroblastos con mutaciones en <i>GBA1</i> muestran estrés del retículo endoplásmico y activación de la vía UPR	68
4. El aparato de Golgi de los fibroblastos con mutaciones en heterocigosis en <i>GBA1</i> presenta alteraciones morfológicas	71
5. Las mutaciones en el gen <i>GBA1</i> alteran la vía de la autofagia	71
6. Alteraciones lisosomales en fibroblastos con mutaciones en <i>GBA1</i>	75
7. El colesterol se acumula en los lisosomas de los fibroblastos con mutaciones en <i>GBA1</i>	78
8. La cloroquina causa la acumulación de colesterol y cuerpos multilamelares en los fibroblastos control pero no en los procedentes de pacientes parkinsonianos	79
9. Los fibroblastos con mutaciones en <i>GBA1</i> presentan alteraciones en el estado redox intracelular	81
10. Las mutaciones N370S y L444P en el gen <i>GBA1</i> en heterocigosis alteran la morfología de la red mitocondrial	83
11. Los fibroblastos con mutaciones en <i>GBA1</i> son más vulnerables a estímulos citotóxicos	85

DISCUSIÓN	89
1. Las mutaciones N370S y L444P en heterocigosis en el gen <i>GBA1</i> cambian la localización subcelular de la enzima GCasa1 alterando la estructura del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi	92
2. 2. Las mutaciones N370S y L444P en heterocigosis en el gen <i>GBA1</i> alteran el proceso de autofagia y la función lisosomal	95
3. Alteración mitocondrial asociada a las mutaciones N370S y L444P en heterocigosis en el gen <i>GBA1</i>	100
4. Las mutaciones N370S y L444P en el gen <i>GBA1</i> causan vulnerabilidad celular en fibroblastos procedentes de pacientes enfermos de Parkinson.	102
5. Importancia biológica de los defectos celulares y moleculares asociados a las mutaciones en <i>GBA1</i> en la enfermedad de Parkinson.	104
CONCLUSIONES.....	107
BIBLIOGRAFÍA	111
ANEXO	129

ABREVIATURAS

α-Syn : Alfa-sinucleína	iPSC : <i>induced Pluripotent Stem Cells</i>
β-Gal : β -galactosidasa	LC3 : Proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos
β-HexA : β -hexaminidasa A	LIMP-2 : <i>Lysosomal integral membrane protein-2</i>
$\Delta\psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial	LAMP1 : Proteína asociada a la membrana del lisosoma-1
AG : Aparato de Golgi	MET : Microscopía electrónica de transmisión
Baf-A1 : Bafilomicina-A1	MME : Membrana mitocondrial externa
CAT : Catalasa	MMI : Membrana mitocondrial interna
CatB : Catepsina B	MPTP : 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
CatD : Catepsina D	mTOR : <i>mammalian target of rapamycin</i>
CMA : Autofagia mediada por chaperonas	PCC : Coeficiente de Pearson
CM-H₂DCFDA : Clorometil-2',7-diclorodihidrofluoresceína diacetato	PFA : Paraformaldehído
CML : Cuerpos multilamelares	PI3K : Fosfatidilinositol-3-quinasa
CQ : Cloroquina	PNGasa-F : Péptido-N-glicosidasa-F
DMEN : <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	RE : Retículo endoplásmico
DHE : Dihidroetidio	ROI : Región de interés
EBSS : <i>Earle's Balanced Salt Solution</i>	ROS : Especies reactivas de oxígeno
EA : Enfermedad de Alzheimer	Sap C : Saposina C
EG : Enfermedad de Gaucher	SNpc : Sustancia negra <i>pars compacta</i>
EP : Enfermedad de Parkinson	tBHP : <i>tert</i> -Butilo hidroperóxido
Endo-H : Endoglicosidasa-H	TFEB : Factor de transcripción EB
ERAD : Degradación asociada al retículo	UPR : Respuesta a proteínas mal plegadas
FBS : Suero fetal bovino	UPS : Sistema proteasoma ubiquitina
IP : Yoduro de propidio	WB : Western blot
GCasa1 : β -Glucocerebrosidasa-1	
GlcCer : Glucocerebrósido	

Introducción

1. La enfermedad de Parkinson

En 1817, el neurólogo británico James Parkinson, describió en su obra “*An Essay on the Shaking Palsy*” la Parálisis Agitante como una enfermedad en la que algunos de los síntomas son el temblor o la marcha festinante (tendencia a inclinar el tronco hacia delante al caminar) (Fig. 1). Sin embargo, fue a finales del siglo XIX cuando el neurólogo francés Jean-Martin Charcote describió en profundidad este trastorno y le denominó enfermedad de Parkinson (EP).

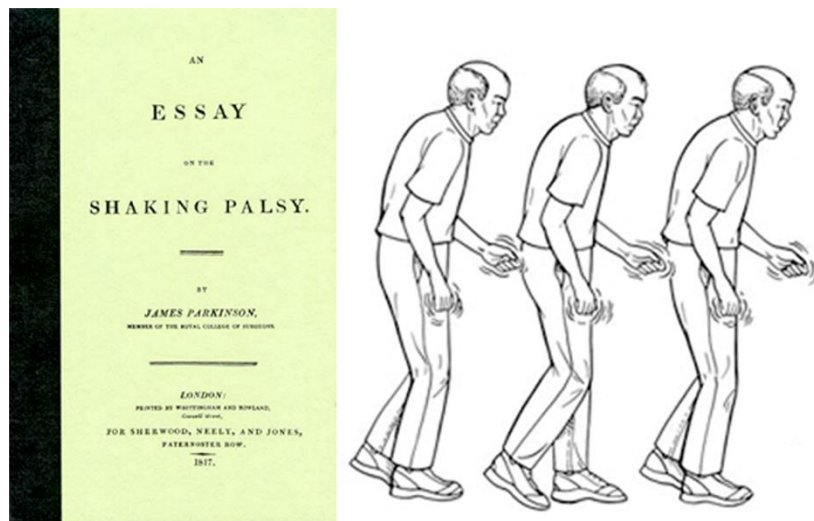


Figura 1. A la izquierda aparece la portada de la obra “*Essay of the Shaking Palsy*”, de James Parkinson. A la derecha, una representación de la marcha festinante y el temblor, típicos de los pacientes con EP.

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad afecta al 1% de la población mayor de 65 años y al 4% mayor de 85 años, siendo más común en hombres que en mujeres (Dorsey *et al.*, 2007). La EP se caracteriza por una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc) (Kalia y Lang, 2015). Estas neuronas forman parte del sistema dopaminérgico, y más concretamente, del circuito motor de los ganglios basales. Éstos son un conjunto de núcleos subcorticales interconectados entre sí que se extienden por el Telencéfalo, Diencefalo y Cerebro Medio (Albin *et al.*, 2018). Las neuronas dopaminérgicas actúan liberando dopamina al núcleo estriado (formado por el núcleo caudado y el putamen), que a su vez emiten proyecciones a otros núcleos específicos, conformando un sistema neural implicado en

el control del movimiento. La dopamina liberada desde las terminales dopaminérgicas en el estriado modula en último término el movimiento (Lanciego *et al.*, 2012). Por tanto su falta en la EP desencadena alteraciones en el control motor explicando los principales síntomas de la EP: temblor en reposo, bradicinesia o lentitud generalizada de los movimientos, rigidez muscular e inestabilidad postural (Halliday *et al.*, 2011). Los síntomas motores son los más representativos, pero no son los primeros en aparecer. Antes aparecen síntomas inespecíficos: alteraciones olfativas como la hiposmia (olfacción disminuida), estreñimiento, trastornos disautonómicos, alteraciones emocionales y afectivas (depresión, ansiedad y apatía), fatiga (Schapira y Tolosa, 2010), alteraciones en el sueño y trastornos de conducta del sueño REM (del inglés, *Rapid Eye Movements*; Chaudhuri *et al.*, 2006) y posteriormente deterioro cognitivo leve (Kalia y Lang, 2015). Pese a toda la sintomatología asociada, el diagnóstico de la EP se centra en los síntomas motores, ya que son los más sobresalientes y específicos de la enfermedad. Histopatológicamente, la EP se caracteriza por la presencia de agregados eosinófilos intracelulares en poblaciones neuronales vulnerables tanto de la SNpc, como de otras zonas del tronco encefálico y la corteza (Dickson *et al.*, 2009). Estas inclusiones se denominan cuerpos de Lewy y están compuestas por acúmulos de proteínas, entre las que se encuentran alfa-sinucleína (α -Syn), ubiquitina y p62 (Forno, 1996). Existen numerosas evidencias científicas que demuestran que los oligómeros solubles y las fibrillas de α -Syn, son las especies tóxicas iniciales que contribuyen a la neurodegeneración en la EP (Rocha *et al.*, 2018).

Aún no se conocen los mecanismos precisos que subyacen a la patogénesis de la EP, pero sí se conocen varios factores que incrementan sustancialmente el riesgo de padecer la enfermedad como son: 1) la edad, 2) factores ambientales o 3) factores genéticos (Lesage y Brice, 2009).

1. La edad y el envejecimiento celular suponen un deterioro de la actividad fisiológica de las células. Así, estos factores desempeñan un papel crucial en la patología de la EP, ya que aumentan la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas ante agentes citotóxicos (Schapira y Jenner, 2011).
2. La primera evidencia que relacionó la EP con ciertas toxinas fue tras el descubrimiento del MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) en 1983. Las

investigaciones de Langston y sus colaboradores comprobaron el desarrollo de la EP en un grupo de toxicómanos tras consumir heroína contaminada con este compuesto. El MPTP se metaboliza en el interior de la célula a MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridina) que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria (NADH/ubiquinona oxidoreductasa), lo que desencadena la muerte neuronal (Langston *et al.*, 1983). A raíz del descubrimiento del MPTP, se han ido conociendo otros productos que presentan unas propiedades químicas similares. Algunos de estos productos son el paraquat o la rotenona; esta última se han utilizado durante muchos años como pesticida, aunque hoy en día su uso está prohibido (Tanner *et al.*, 2011).

No obstante, diversos estudios epidemiológicos han demostrado que existen factores protectores frente a la EP. Un ejemplo de ellos, conocido desde hace décadas, es el tabaquismo, que presenta una relación inversa con la EP. Los fumadores pueden ver reducido el riesgo de padecer la EP hasta en un 40% (Hernán *et al.*, 2002). Por otro lado, también se ha comprobado que el consumo de cafeína está asociado con una disminución del riesgo de desarrollar la enfermedad (Hernán *et al.*, 2002). Algo similar ocurre con el ácido úrico, cuyos niveles altos predisponen a padecer hipertensión, pero que ejerce una función protectora ante agentes oxidativos, los cuales aumentan la vulnerabilidad de las neuronas (Campdelacreu, 2014).

3. Los factores genéticos relacionados con la EP se comenzaron a describir hace unos 20 años, aunque cada año se descubren nuevas mutaciones implicadas en la neurodegeneración. Actualmente, un importante número de casos (alrededor de 5-10%) están relacionados con mutaciones en diversos genes, las cuales pueden actuar como factores Mendelianos (sólo explican el 3-5% de los casos genéticos) o como factores de riesgo. El 90% restante se asocia a casos esporádicos, no cursan con una mutación genética conocida (Billingsley y Singleton, 2018; Lin y Farrer, 2014).

1.1. Factores genéticos asociados a la enfermedad de Parkinson

Hasta la fecha, se han identificado 15 genes relacionados directamente con las formas monogénicas de la enfermedad. La mayor parte de los casos se deben a

mutaciones en los genes *SNCA*, *LRRK2*, *PRKN*, *PINK1*, *DJ1* y *ATP13A2* (Kalia y Lang, 2015). Las principales características de estos genes se resumen en la tabla 1.

Además de las formas monogénicas de la enfermedad, hay descritos otros genes cuyas mutaciones incrementan notablemente el riesgo de padecerla. El mayor factor de riesgo genético es el gen *GBA1* (Gegg y Schapira, 2018; Sidransky y Lopez, 2012), el cual codifica la proteína β -glucocerebrosidasa-1 (GCase1).

2. GBA1 y la enfermedad de Parkinson

2.1. Características de la β -glucocerebrosidasa-1

La enzima lisosomal GCase1 es una hidrolasa que se encarga de romper el glicolípido glucocerebrósido (GlcCer) en glucosa y ceramida, la cual es precursor de esfingolípidos complejos como glicosfingolípidos y esfingomielina. La GCase1 está codificada por el gen *GBA1* (1q22) y las mutaciones en homocigosis en este gen son las causantes de la enfermedad de Gaucher (EG), la cual es la enfermedad autosómica recesiva de desórdenes lisosomales más frecuente (Gegg y Schapira, 2018; Migdalska-Richards y Schapira, 2016). La GCase1 madura está compuesta por 497 aminoácidos, presenta un peso molecular entre 59 y 69 kDa (Grabowski *et al.*, 1990) y se compone de 3 dominios discontinuos. El dominio I consiste en una lámina- β antiparalela rodeada por un bucle. Dentro de este dominio hay dos puentes disulfuro que pueden ayudar al plegamiento adecuado de la proteína (Dvir *et al.*, 2003; Moharrama *et al.*, 2006). El dominio II es un barril- β de 8 cadenas, formando un dominio independiente que se asemeja a un pliegue de inmunoglobulina (Ig) (Lieberman *et al.*, 2009). El dominio III es el dominio catalítico y está compuesto por un barril TIM (β/α)₈ triosa fosfato isomerasa) y además de albergar el sitio activo, tiene tres cisteínas libres que se cree que junto con las cisteínas involucradas en los puentes disulfuro del dominio I son cruciales para conservar a la enzima activa, permitiendo romper el glucocerebrósido.

Se han identificado alrededor de 300 mutaciones del gen *GBA1*, pero las mutaciones N370S (c.1226A>G, resultante en el cambio del aminoácido 370: asparagina por serina) y L444P (c.1448T>C, resultante en el cambio del aminoácido 444: leucina por prolina) son las más frecuentes tanto en la EG como en la EP (Beavan y Schapira, 2013). La estructura tridimensional de la GCase1 y la localización estructural de ambas mutaciones

se muestra en la Fig 2. Las mutaciones L444P y N370S no afectan al sitio catalítico, pero probablemente desestabilicen la estructura nativa de la GCasa1 (Lieberman *et al.*, 2007).

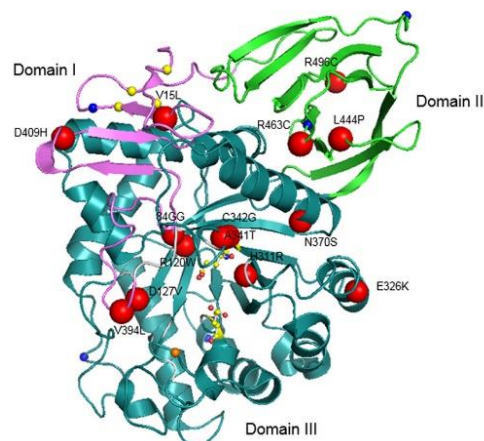


Figura 2. Esquema tridimensional de los dominios de la GCasa1 en el que se aprecia la localización de las mutaciones N370S y L444P (modificada de Smith *et al.*, 2017).

La mutación L444P tiene lugar en el núcleo hidrofóbico del dominio II, a una distancia considerable del sitio activo de la enzima. Esto sugiere que el dominio II deber tener una función importante ofreciendo soporte estructural o sitio de unión a la Saposina C (Sap C). Esta proteína Sap C es requerida como activador de la GCasa1, a través del dominio hidrofóbico del dominio II, ayudando a que ésta interaccione con el GlcCer (Smith *et al.*, 2017; Tamargo *et al.*, 2012; Vaccaro *et al.*, 2010). La sustitución de aminoácidos que provoca la mutación L444P causa rigidez en esqueleto de la proteína, lo que puede alterar la función del dominio II ya que modifica las propiedades hidrofóbicas del mismo (Lieberman, 2011). Por otro lado, la mutación N370S se localiza en la hélice α más larga entre los dominios II y III, y por lo tanto, muy lejos del sitio activo, lo que sugiere que debe tener un efecto estructural, al igual que ocurre con la mutación L444P (Smith *et al.*, 2017). La asparagina 370 participa de manera indirecta en el mantenimiento de la conformación del sitio activo, por lo que la sustitución de esta asparagina por una serina hace que aumente la distancia desde el lazo 3 de la hélice desestabilizándolo y dificultando la capacidad de la GCasa1 de unirse al sustrato (Lieberman *et al.*, 2007).

2.2. Conexión entre la enfermedad de Parkinson y mutaciones en el gen *GBA1*

Como se ha mencionado anteriormente, mutaciones en homocigosis en el gen *GBA1* son las causantes de la EG, la cual es la enfermedad autosómica recesiva de desórdenes lisosomales más frecuente (Gegg y Schapira, 2018; Migdalska-Richards y Schapira, 2016). La acumulación de GlcCer en los macrófagos de los tejidos viscerales (hígado, bazo, huesos y médula ósea) conduce a un agrandamiento del hígado y el bazo, anemia, anomalías esqueléticas y problemas de coagulación (Grabowski, 2008). Los tres tipos de EG conocidos cursan con los síntomas anteriormente descritos, pero además los tipos 2 y 3 cursan con discapacidad cognitiva. Aunque se pensaba que los pacientes con EG tipo 1 no desarrollaban neurodegeneración, enseguida se evidenció que un subconjunto de pacientes con EG mostraban características típicas de la EP (Neudorfer *et al.*, 1996; Turpin *et al.*, 1987). Un estudio realizado por Sidransky *et al.*, en 2009 confirmó la existencia de una asociación entre la EP y las mutaciones en *GBA1*. Se estima que las mutaciones en *GBA1* incrementan en 20 veces la probabilidad de desarrollar la EP y que un 7-10% de los casos de EP presentan mutaciones en este gen (Schapira, 2015). Este porcentaje aumenta en la población europea de judíos Ashkenazi hasta un 17-31%. Algunas de las características patológicas que presenta la EP asociada con mutaciones en *GBA1* son el mayor deterioro cognitivo y demencia, así como un inicio temprano de la enfermedad (Abeliovich y Gitler, 2016; Mata *et al.*, 2016; Setó-Salvia *et al.*, 2012; Sidransky *et al.*, 2009). El análisis *post-mortem* de tejido cerebral de pacientes con la EP y mutaciones en *GBA1* en heterocigosis muestra una disminución significativa de la actividad de la GCasa1, ocurriendo el mayor descenso (58%) en la sustancia negra (Gegg *et al.*, 2012). También se ha demostrado que la GCasa1 junto con la α -Syn, son los componentes principales de los cuerpos de Lewy en estos pacientes (Goker-Alpan *et al.*, 2010; Westbroek *et al.*, 2011). La GCasa1 desempeña un papel importante en la supervivencia neuronal, como demuestran experimentos con ratones *knock-out* condicionales para *GBA1*. Estos animales presentan elevados niveles de GlcCer en el cerebro, lo que les lleva a una pérdida neuronal (Enquist *et al.*, 2007). Además, esta acumulación de GlcCer (y de otros lípidos derivados) en los lisosomas, promueve la acumulación de oligómeros de α -Syn solubles, que al polimerizar favorecen la formación de fibrillas insolubles. Esto hace que se reduzca la

degradación de proteínas en los lisosomas causando neurotoxicidad (Murphy *et al.*, 2014; Stojkovska *et al.*, 2017). Esta interrelación se ha visto corroborada al observarse que la sobreexpresión de variantes de GCasa1 mutante produce un aumento de los niveles de α -Syn, contrariamente a lo que ocurre con la sobreexpresión del fenotipo salvaje (Cullen *et al.*, 2011). La acumulación de α -Syn inhibe la maduración del lisosoma y la actividad de la GCasa1 (Gegg *et al.*, 2012; Schapira, 2015), produciéndose una retroalimentación positiva del mecanismo de inhibición del transporte de la GCasa1 desde el aparato de Golgi (AG) hasta los lisosomas (Fig. 3). Este mecanismo se ha propuesto como causa de la neurodegeneración (Maor *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que la α -Syn forma un complejo con la GCasa1 en la membrana del lisosoma mediante interacciones electrostáticas. Por tanto, la disminución de los niveles de GCasa1 en el lisosoma así como una interacción más débil con la α -Syn, reducen la degradación de este orgánulo favoreciendo que la α -Syn se acumule (Yap *et al.*, 2013).

A pesar de que existen numerosos estudios que han ayudado a esclarecer el papel de las mutaciones en el gen *GBA1* sobre la patogenicidad de la EP, los mecanismos moleculares sin conocerse por completo. Algunos de estos mecanismos incluyen defectos en la vía autofágica-lisosomal, incremento de la agregación de la α -Syn, alteraciones en la homeostasis del calcio, disfunción mitocondrial y estrés del retículo endoplásmico (RE) (Fernandes *et al.*, 2016; Sanchez-Martinez *et al.*, 2016; Schondorf *et al.*, 2018).

GEN	PROTEÍNA	HERENCIA	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
SNCA	α -sinucleína	Autosómica dominante	Mutaciones puntuales, duplicaciones y triplicaciones. Interviene en la plasticidad sináptica, tráfico vesicular y liberación del neurotransmisor. Inicio temprano de la EP (mutaciones) y mayor severidad (aumento número copias del gen).	Houlden y Singleton, 2012; Konno <i>et al.</i> , 2016; Rocha <i>et al.</i> , 2018
LRRK2	LRRK2	Autosómica dominante	Participa en el crecimiento de neuritas, tráfico vesicular, mantenimiento del citoesqueleto y degradación proteínas. Mutaciones en <i>LRRK2</i> son la causa más frecuente de las formas autosómicas dominantes de la EP	Dias <i>et al.</i> , 2013; Gómez-Suaga <i>et al.</i> , 2014
PRKN	Parkina	Autosómica recesiva	Regulación de la eliminación de mitocondrias dañadas, participa en la degradación de proteínas por la vía del proteasoma. Pacientes con mutaciones en <i>PRKN</i> no presentan cuerpos de Lewy. Mutaciones en <i>PRKN</i> son la causa más frecuente de las formas autosómicas recesivas de la EP	Kalia y Lang, 2015; Lin y Farrer, 2014; Schulte y Gasser, 2011
PINK1	PINK1	Autosómica recesiva	Localización mitocondrial. Involucrada en protección neural ante estrés oxidativo. Participa junto con parkina, en la eliminación de las mitocondrias por mitofagia. Mutaciones poco frecuentes	Pickrell y Youle, 2015; Sedlackova y Korolchuk, 2018
DJ1	DJ-1	Autosómica recesiva	Localización citosólica. Papel en el estrés oxidativo y mantenimiento del $\Delta\psi_m$. Mutaciones inducen fragmentación mitocondrial y descenso de actividad complejo I de la cadena respiratoria	Shi <i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> , 2012
ATP13A2	ATP13A2	Autosómica recesiva	Localización lisosomal. Mutaciones provocan mitocondrias fragmentadas y disminución tasa consumo de oxígeno y producción de ATP	Grünewald <i>et al.</i> , 2012; Ramirez <i>et al.</i> , 2006

Tabla 1. Genes que causan la mayoría de las formas monogénicas de la EP y sus características.

2.3 Alteración de la homeostasis celular causada por mutaciones en *GBA1*

2.3.1 Estrés del retículo endoplásmico

La GCasa1 es una glicoproteína lisosomal que, en su proceso de síntesis en el RE, une una cola de 14 azúcares al primer residuo de asparagina de la proteína naciente. Cuando la GCasa1 pasa al AG, esa cola de azúcares sufre modificaciones (eliminación de residuos de manosas y glucosas) para seguir con el proceso de maduración. Finalmente es transportada a los lisosomas como proteína madura a través de la vía secretora (Helenius y Aebi, 2004).

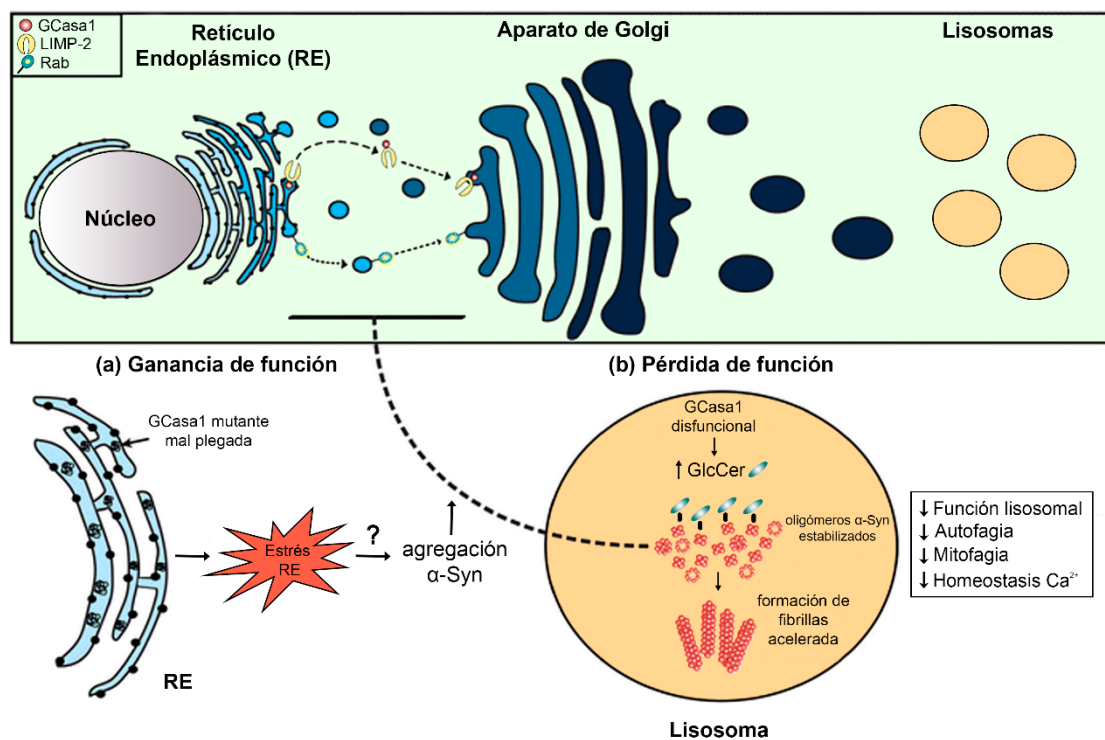


Figura 3. Posibles mecanismos de ganancia y pérdida de función en la patogénesis de la EP asociada a mutaciones en *GBA1*. (a) La GCasa1 mutante mal plegada (p. ej., N370S, L444P) en el RE causa estrés de RE y puede conducir a la agregación α -Syn e inhibición del tráfico de proteínas desde el RE hacia el aparato de Golgi. (b) La pérdida de la función de la GCasa1 conduce a la acumulación de lípidos como GlcCer, que interactúa directamente con oligómeros de α -Syn y estabilizándolos en el compartimento lisosomal. Esta acumulación inhibe el tráfico de la GCasa1, generando un bucle de retroalimentación positiva de la auto-propagación de la enfermedad. La pérdida de la función de la GCasa1 también puede causar disfunción lisosomal general, de las de mitofagia y autofagia, así como de la homeostasis del Ca^{2+} (modificada de Stojkowska *et al.*, 2018).

Diversos estudios establecen que mutaciones en la GCasa1 causan un defecto en el tráfico entre el RE y el Golgi. Si la proteína está mutada, no se pliega correctamente y queda retenida en el RE, donde diferentes chaperonas intentan otorgarle la conformación correcta. Finalmente, si este proceso no se consigue completar exitosamente, se desencadena la respuesta ERAD (degradación asociada al RE) y las proteínas mutadas o mal plegadas pasan a ser degradadas en el proteasoma (Bendikov-Bar y Horowitz, 2012; Ron y Horowitz, 2005). Estudios en modelos de la EG con diferentes mutaciones en *GBA1* en homocigosis, muestran claramente una retención de la GCasa1 en RE (Bendikov-Bar *et al.*, 2011; Kurzawa-Akanbi *et al.*, 2012). La acumulación de proteínas mal plegadas en el RE activa la vía de señalización UPR (respuesta a proteínas mal plegadas) (Fig. 4), lo que a su vez puede inducir la autofagia, proceso fisiológico natural de las células, por el que se eliminan proteínas dañadas potencialmente tóxicas, así como agregados proteicos y se produce la renovación de orgánulos viejos o dañados mediante degradación lisosomal. Así se intenta reducir el estrés del RE eliminando los agregados proteicos insolubles de una manera más eficiente (Kim *et al.*, 2008). En muestras de cerebro *post-mortem*, concretamente del putamen, procedentes de sujetos con EP que portan mutaciones en *GBA1*, se ha observado un aumento de los marcadores UPR (Gegg *et al.*, 2012; 2015), así como en neuronas derivadas de iPSCs (del inglés, *induced pluripotent stem cells*) de pacientes parkinsonianos con estas mutaciones, con mayor expresión de chaperonas asociadas con la UPR, incluyendo BiP y calnexina (Fernandes *et al.*, 2016). También aumenta la liberación de calcio del RE en neuronas derivadas de iPS (Schöndorf *et al.*, 2014) o en fibroblastos procedentes de pacientes parkinsonianos con mutaciones en *GBA1* (Kilpatrick *et al.*, 2016).

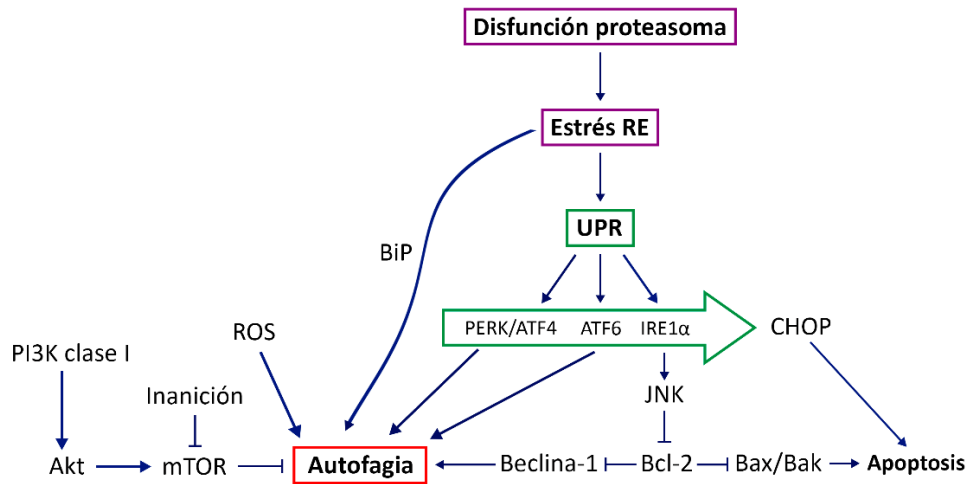


Figura 4. Integración de la autofagia con los mecanismos de regulación de la homeostasis de retículo. La chaperona del retículo BiP bajo condiciones de estrés deja de reprimir a PERK/ATF4, ATF6 e IRE1α e induce la vía UPR, además de inducir la autofagia. Esta UPR puede desencadenar en la inducción de la apoptosis o de la autofagia, dependiendo de los niveles de JNK y CHOP (modificada de Benbrook y Long, 2012).

2.3.2 Defectos en la vía de la autofagia y alteraciones lisosomales

La acumulación de proteínas es una característica común en varias enfermedades neurodegenerativas, lo que ha llevado a plantear que alteraciones en el proceso de la autofagia pueden ser responsables de la agregación de proteínas tóxicas produciéndose así el inicio de la enfermedad (Yamamoto y Simonsen, 2011). La autofagia es el único mecanismo conocido que tienen las células eucariotas para degradar agregados proteicos y orgánulos como el RE y la mitocondria (Lynch-Day *et al.*, 2012; Migdalska-Richards y Schapira, 2016; Yang y J., 2010). La autofagia se clasifica en tres tipos: macroautofagia (comúnmente denominada autofagia), microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA), siendo esta última la vía por la cual se degrada la α -Syn principalmente (Xie and Klionsky, 2007). Hay diversos indicios de que una mal funcionamiento de los lisosomas puede contribuir a la patogénesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas (Dehay *et al.*, 2013). En los últimos años, la disfunción de la autofagia se ha convertido en la causa más probable en la patogénesis de la EP. En concreto, la macroautofagia y la CMA se han relacionado con la acumulación, agregación y transmisión célula-célula de la α -Syn (Gegg y Schapira, 2018). Esta transmisión implica la liberación de la α -Syn desde las células donantes al espacio extracelular, desde donde puede ser internalizada por otras neuronas favoreciéndose

así la agregación de la α -Syn endógena y la propagación de los cuerpos de Lewy (Gallegos *et al.*, 2015). Utilizando células humanas de neuroglioma, un estudio reciente demuestra mayor liberación de α -Syn en vesículas extracelulares positivas para diferentes proteínas autofágicas en condiciones de inhibición de la autofagia (Minakaki *et al.*, 2018).

La autofagia comienza con la etapa de nucleación generando el fagóforo, y después se forman vesículas de autofagia con doble membrana o autofagosomas, que engloban el material que se va a degradar. Posteriormente los autofagosomas se fusionan con los lisosomas dando lugar a los autofagolisosomas (Fig. 5) (Wong y Cuervo, 2010). El proceso está regulado por las proteínas denominadas ATGs. Hay dos vías para inducir la autofagia, una dependiente y otra independiente de mTOR (del inglés, *mammalian target of rapamycin*) y la de mTOR. En la dependiente de mTOR, el principal regulador negativo es el propio mTOR, ya que la presencia de nutrientes activa esta proteína en su estado fosforilado inhibiendo la autofagia. En cambio, en condiciones de inanición, se inhibe p-mTOR y éste a su vez deja de reprimir al complejo ULK-1 permitiendo la iniciación de la autofagia (Moors *et al.*, 2017). La proteína mTOR interviene en la formación de la doble membrana del autofagosoma y esto es necesario para que la ruta funcione con normalidad. Esta vía también se inhibe por factores de crecimiento. Mientras que la ausencia de nutrientes, la rapamicina, el calcio intracelular o el estrés activan la autofagia (Jaeger y Coray, 2009; Wong y Cuervo, 2010). La vía independiente de mTOR está regulada por las proteínas Beclina1 y fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) formando el complejo de clase III PI3K – Beclina1. La proteína Beclina1 se localiza en la membrana del RE y está regulada por el dímero anti-apoptótico BCL-2 y BCL-XL. Las señales de inicio de la autofagia hacen que Beclina1 se disocie de BCL-2 y el complejo PI3K-Beclina1 induce la formación del autofagosoma (Guo *et al.*, 2018). Ambas vías confluyen en la formación de la membrana del fagóforo, y para que éste se transforme en el autofagosoma es necesario que la proteína citosólica LC3I (del inglés, *microtubule-associated protein light chain*) sea conjugada a LC3II, con el lípido fosfatidiletanolamina, pasando a formar parte de la membrana del autofagosoma (Fig. 5) (Mehrpour *et al.*, 2010).

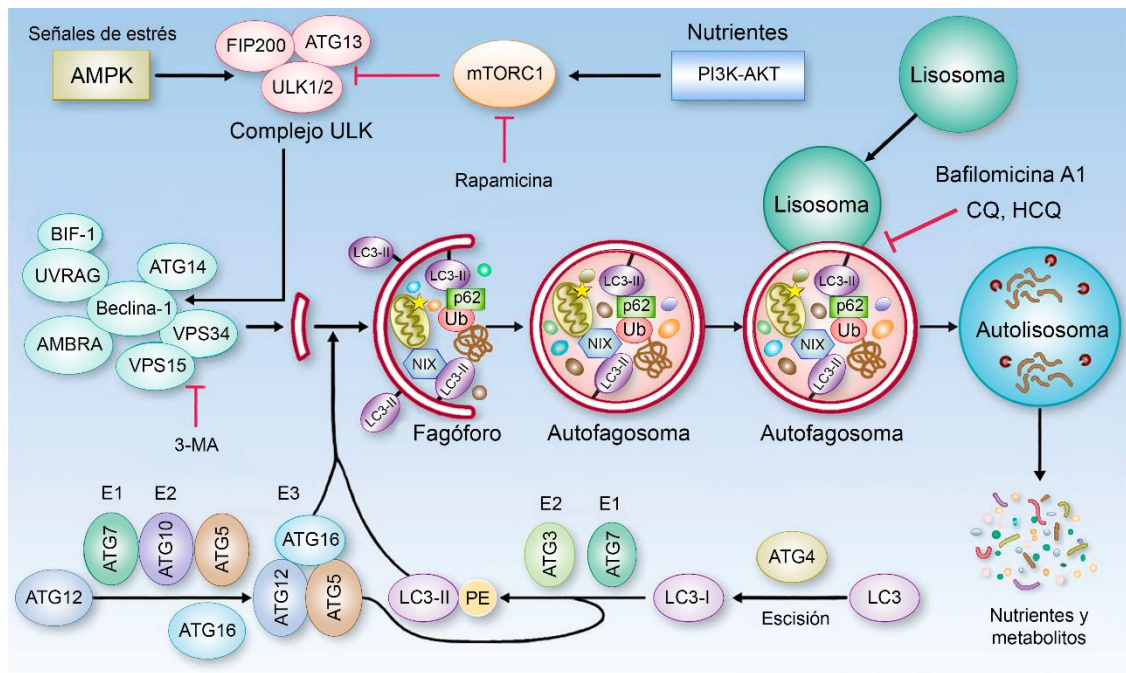


Figura 5. Principales marcadores y mecanismos de autofagia (modificada de Cicchini, *et al.*, 2015).

La especificidad del proceso de autofagia viene dada por el complejo p62/SQSTM1, que se une a proteínas u orgánulos que están ubiquitinados. Después, el agregado p62-proteína cargo es reconocido por LC3II y todo el complejo queda incluido dentro del autofagosoma (Johansen y Lamark, 2011). En enfermedades neurodegenerativas la proteína p62, se detecta en agregados proteicos ubiquitinados, incluyendo los cuerpos de Lewy en la EP (Kuusisto *et al.*, 2001). Dado que proteínas implicadas en la autofagia, así como los autofagosomas están presentes en estos cuerpos de Lewy, la autofagia parece una diana de trastornos relacionados con la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Dexter y Jenner, 2013). Hay estudios que sugieren que un defecto en la maduración del autofagosoma y en su fusión con el lisosoma podría ser una de las principales causas de la acumulación de vacuolas autofágicas y esto podría estar involucrado en la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la EP (Abeliovich y Gitler, 2016). De este modo, el déficit de la GCase1 en los lisosomas puede desencadenar la neurodegeneración debido a defectos en la fusión de los endosomas con los lisosomas, alterando el flujo autofágico e impidiendo la correcta eliminación de los autofagosomas (Schöndorf *et al.*, 2014). Este defecto en el aclaramiento autofágico haría que se acumularan elementos potencialmente citotóxicos, lo que podría conducir a una

acumulación de los lisosomas o una disfunción general de este orgánulo (Schöndorf *et al.*, 2014). Por otro lado, también se ha visto una disminución de proteínas asociadas a lisosomas como LAMP1 (del inglés, *lysosome-associated membrane protein 1*), Catepsina (Cat) D o B (Dehay *et al.*, 2010) en neuronas de la sustancia negra de pacientes con EP esporádica.

La mayoría de los genes implicados tanto en la función como en la biogénesis de los lisosomas forman parte de una coordinada red de señalización, donde uno de los reguladores más importantes es el factor de transcripción EB (TFEB) (Cortes y La Spada, 2019). Entre sus dianas transcripcionales hay genes que codifican hidrolasas lisosomales (entre las que se encuentra la GCasa1), proteínas de la membrana del lisosoma que median la interacción del lisosoma con otras estructuras celulares, y componentes de la H⁺-ATPasa vacuolar que participa en la acidificación lisosomal (Sardiello *et al.*, 2009). Además, TFEB también desempeña un papel en la autofagia. En condiciones basales TFEB es fosforilado por p-mTOR, impidiendo que se transloque al núcleo. En condiciones de inanición, al disminuir los niveles de p-mTOR, TFEB se transloca del citoplasma al núcleo donde es activo y regula la expresión de genes que codifican proteínas que intervienen en el proceso de autofagia, como es el caso de ATG9, LC3B o p62/SQSTM1 (Settembre y Ballabio, 2011; Settembre *et al.*, 2013). Existen diversos estudios que han relacionado a TFEB con la neurodegeneración (Cortes y La Spada, 2018), en los que se ha demostrado que la localización, actividad y función de TFEB se encuentra alterada en algunas enfermedades neurodegenerativas como la EP (Decressac *et al.*, 2013), la EA (Reddy *et al.*, 2016), la enfermedad de Huntington (Tsunemi *et al.*, 2012) o la esclerosis lateral amiotrófica (Wang *et al.*, 2016). Concretamente se ha demostrado que la chaperona molecular Ambroxol, fármaco que facilita el transporte de la GCasa1 hasta los lisosomas incrementando su actividad (Ambrosi *et al.*, 2014; Maegawa *et al.*, 2009; McNeill *et al.*, 2014), activa a TFEB en neuronas corticales de ratón que portan mutaciones en *GBA1* (Magalhaes *et al.*, 2018). De esta manera, el fármaco incrementa tanto la cantidad de lisosomas como el contenido lisosomal y mejora la actividad de la GCasa1. Además, un estudio llevado a cabo por Siebert *et al.*, en 2014 demostró que la sobreexpresión de la α -Syn en el cerebro de ratas induce la retención de TFEB en el

citoplasma. Esto hace que se inhiba la función lisosomal, acumulándose la α -Syn en los lisosomas favoreciendo su progresiva polimerización y formando las fibrillas insolubles.

2.3.3 Alteraciones mitocondriales

2.3.3.1 Estrés oxidativo

El término de estrés oxidativo describe las condiciones que resultan del desequilibrio entre la producción de radicales libres y su eliminación. Las mitocondrias son la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como las que tienen la mayor capacidad antioxidante (Fig. 6) (Franco-Iborra, *et al.*, 2018). Una acumulación prolongada de ROS, tales como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puede generar daños en el ADN, proteínas y lípidos (Stefanoni, *et al.*, 2011). El anión superóxido puede ser transformado en peróxido de hidrógeno a través de la enzima citoplasmática superóxido dismutasa (SOD1). Aunque este peróxido de hidrógeno no es de las especies más reactivas, a partir de él se puede generar el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), probablemente el radical más reactivo ya que puede reaccionar prácticamente con todas las biomoléculas celulares (Halliwell y Gutteridge, 1984). Es por esto que el peróxido de hidrógeno debe ser rápidamente eliminado por la acción de diferentes enzimas como la catalasa o las glutatión peroxidasas.

La primera evidencia que relacionó la disfunción mitocondrial y la EP se debió al descubrimiento del MPTP, ya que, como se ha comentado anteriormente, inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones (Langston *et al.*, 1983). Desde entonces, multitud de estudios han evidenciado la implicación de las alteraciones mitocondriales en la EP, entre las que se incluyen reducción de varios de los complejos de la cadena respiratoria (Schapira, 1990), disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) acompañado con un incremento en la producción de ROS (Gandhi *et al.*, 2009; Piccoli *et al.*, 2008) o alteraciones en los procesos de fusión-fisión (Poole *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2006). Apoyando esta idea, se ha demostrado que ratones transgénicos que sobreexpresan la catalasa humana presentan atenuación de las ROS derivadas del daño inducido por el MPTP, disminuyendo así la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Perier *et al.*, 2010, 2013). La SNpc es particularmente sensible al estrés oxidativo, probablemente debido a su entorno dopaminérgico, puesto que la dopamina es fácilmente oxidable generando quinonas reactivas de dopamina y ROS (Franco-Iborra

et al., 2018). Recientemente, Burbulla *et al.*, (2017) han demostrado que neuronas dopaminérgicas derivadas de pacientes con Parkinson idiopático y Parkinson familiar, tenían una acumulación de dopamina oxidada y una disminución de la respiración celular basal.

Dado que las mitocondrias son susceptibles al daño oxidativo derivado de su propio metabolismo, se requieren mecanismos eficientes para su eliminación que eviten el desencadenamiento de la muerte celular por apoptosis, que estos orgánulos pueden señalar. Este proceso se desencadena con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MME), lo que provoca la liberación de factores pro-apoptóticos desde el espacio intermembrana al citoplasma celular, tales como el citocromo C. La liberación de estos factores inicia una cascada de señalización que termina en la activación de caspasas ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7) que conducen a la muerte celular (Galluzzi *et al.*, 2018; Shi, 2002). En base a esto, es evidente que las alteraciones en la actividad de la GCasa1 pueden inducir defectos en la eliminación del contenido autofágico, lo que favorecería la acumulación de mitocondrias disfuncionales. Esta situación se vería doblemente reforzada ya que la oxidación de la dopamina inhibe la actividad de la GCasa1, incrementando la disfunción lisosomal (Burbulla *et al.*, 2017).

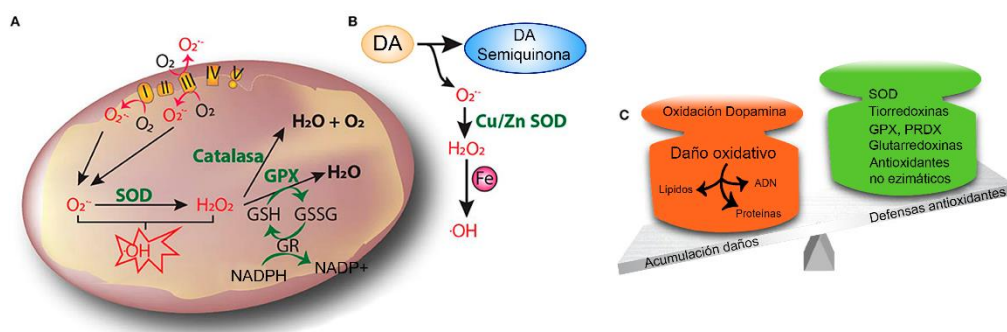


Figura 6. El estrés oxidativo puede causar disfunción, y eventualmente, muerte celular. (A) Agentes oxidantes y radicales superóxido son productos de la fosforilación oxidativa, haciendo a la mitocondria el principal generador de especies reactivas de oxígeno (ROS). (B) La dopamina se puede oxidar a quinonas reactivas de dopamina, lo que contribuye al aumento de los niveles de ROS. (C) El estrés oxidativo ocurre cuando se desestabiliza el equilibrio entre la producción de ROS y la actividad celular antioxidante. Un exceso de ROS causa peroxidación de lípidos, daño en el ADN y oxidación de proteínas. La acumulación de radicales libres causa disfunción mitocondrial y contribuye a la propagación del estrés relacionado con la fisiopatología neuronal (modificada de Franco-Iborra *et al.*, 2018).

2.3.3.2 Estructura y dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos cuya estructura varía constantemente desde una red tubular hasta mitocondrias individuales. Esta red mitocondrial está controlada por el balance entre varios procesos: la fusión y fisión mitocondrial, la biogénesis mitocondrial *de novo* y la eliminación de las mitocondrias viejas o disfuncionales (Ploumi *et al.*, 2017). Para adaptarse a los cambios en el ambiente celular, las mitocondrias están continuamente fusionándose y fisionándose. La fisión mitocondrial es necesaria para crear mitocondrias nuevas, pero también para el transporte y la eliminación de las que se encuentren dañadas o disfuncionales, de hecho, la fisión mitocondrial precede a la activación de las caspasas y la condensación de la cromatina en los procesos de muerte celular (Galluzzi *et al.*, 2018). Este proceso está regulado por varias proteínas entre las que se encuentran Drp1 (del inglés, *dynamin-related protein*), Fis1 o Mff (del inglés, *mitochondrial fission factor*) (Franco-Iborra *et al.*, 2018; Loson *et al.*, 2013). Por el contrario, la fusión mitocondrial produce mitocondrias elongadas y tubulares, las cuales permiten el intercambio de material como el ADN mitocondrial (ADNmt) o proteínas. De esta manera pueden compensar sus defectos de función y repararse para evitar ser degradadas (Suárez-Rivero *et al.*, 2016). Las principales proteínas que regulan este proceso son la mitofusina 1 y mitofusina 2 en la MME, y OPA-1 en la membrana mitocondrial interna (MMI) (Cipolat *et al.*, 2004).

Las mitocondrias deterioradas pueden ser marcadas selectivamente y eliminadas a través del proceso de mitofagia, un tipo de autofagia específico para las mitocondrias. Este proceso es especialmente importante en células que tienen una elevada demanda energética y baja capacidad de regeneración, como es el caso de las neuronas. Por este motivo la acumulación de mitocondrias disfuncionales se plantea como un aspecto fundamental en la patología de enfermedades neurodegenerativas (Lin y Beal, 2006; Sedlackova y Korolchuk, 2018). La mitofagia se puede desencadenar por diferentes motivos como la despolarización mitocondrial, desregulación de la señalización del calcio, hipoxia o de manera programada (Palikaras y Tavernarakis, 2014). La vía clásica de mitofagia es a través de la kinasa PINK1 y la E2 ubiquitina ligasa parkina y se basa en la pérdida del $\Delta\psi_m$. En condiciones basales, PINK1 se importa de forma constitutiva dentro de las mitocondrias sanas, se escinde y se degrada por el proteasoma. En cambio,

cuando existen daños en este orgánulo y la importación de proteínas mitocondriales se ve afectada, PINK1 se acumula en la MME y fosforila directamente las cadenas de ubiquitina unidas a las proteínas de la membrana externa. La presencia de fosfoubiquitinas estimula el reclutamiento y la activación de parkina, que también es fosforilada por PINK1, lo que lleva a su completa activación (Kazlauskaite *et al.*, 2014; Koyano *et al.*, 2014; Sedlackova y Korolchuk, 2018). Una vez que Parkina está localizada en la mitocondria, induce la ubiquitinación de proteínas de la MME y consecuentemente su degradación por el proteasoma (Chen y Dorn, 2013; Gegg *et al.*, 2010; Glauser *et al.*, 2011; Poole *et al.*, 2010). De esta manera, se inhibe la fusión y el tráfico de las mitocondrias disfuncionales, permitiendo que la ubiquitina sea reconocida por el complejo p62/SQSTM1 y eliminando el orgánulo vía mitofagia.

El estudio de la GCasa1, así como de los procesos celulares y moleculares en los que participa y que pueden verse afectados por mutaciones en *GBA1*, presenta un gran interés para comprender la etiopatología de la EP asociada a estas mutaciones. De esta manera, se facilitaría el desarrollo de fármacos y/o terapias con capacidad para modular el proceso degenerativo, proteger a las neuronas en estadios tempranos de degeneración y alterar el curso de la enfermedad y la manifestación de los síntomas.

Objetivos

OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar la influencia de las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA1* en la función lisosomal y el proceso de autofagia en fibroblastos procedentes de pacientes con la enfermedad de Parkinson con estas mutaciones.
2. Caracterizar la vulnerabilidad de fibroblastos con las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA1* en heterocigosis procedentes de pacientes con la enfermedad de Parkinson

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la influencia de las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA1* en los niveles de la proteína β -glucocerebrosidasa-1 en fibroblastos procedentes de pacientes parkinsonianos con estas mutaciones.
2. Monitorizar la vía de la autofagia a través del análisis de marcadores de las distintas etapas del proceso en fibroblastos con las mutaciones N370S o L444P procedentes de pacientes con la enfermedad de Parkinson.
3. Caracterizar la función lisosomal y evaluar la posible acumulación de colesterol en los lisosomas en fibroblastos con las mutaciones N370S o L444P procedentes de pacientes con la enfermedad de Parkinson.
4. Estudiar la viabilidad y muerte celular de fibroblastos procedentes de pacientes parkinsonianos con las mutaciones N370S o L444P en el gen *GBA1* ante estímulos citotóxicos.
5. Analizar el papel de las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA1* de fibroblastos procedentes de pacientes parkinsonianos en el estrés oxidativo mediante el estudio de especies reactivas de oxígenos y su posible implicación en alteraciones estructurales de la mitocondria.

Materiales
 y
 Métodos

1. Fibroblastos derivados de pacientes, cultivo y tratamientos

1.1. Obtención de fibroblastos humanos

Los fibroblastos se obtuvieron de biopsias de piel de la axila realizadas a once pacientes con la EP, once sujetos control y a dos pacientes con la EG tipo I. Los pacientes con EP fueron seleccionados por presentar las mutaciones N370S o L444P en heterocigosis en el gen *GBA1*. Todos los sujetos fueron informados del procedimiento aprobado por el Comité Ético para el Uso de Sujetos Humanos para la Investigación. Los síntomas motores y la gravedad de la enfermedad de los pacientes con EP se evaluaron de acuerdo con la Escala Unificada de Calificación de la Enfermedad de Parkinson (UPDRS) y los puntajes de Hoehn & Yahr. El diagnóstico de demencia se basó en una puntuación >1 en la escala de Demencia clínica (CDR) y el cumplimiento de los criterios 294.1 para la EP con demencia en el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, cuarta edición revisada (DSM IV-TR) (Setó-Salvia *et al.*, 2012). La tabla 2 muestra las principales características genéticas y fenotípicas de cada individuo.

Las muestras de la piel fueron procesadas en las 24 h siguientes a la obtención de las biopsias. En primer lugar, las muestras se lavaron con la solución HBSS (del inglés, *Hank's Balanced Salt Solution*; Gibco) en placas de plástico estériles en presencia de agentes antibióticos y antimicóticos (1%). Tras retirar el exceso de grasa de las muestras con unas pinzas, se procedió a su incubación con 0.25% (v/v) de tripsina-EDTA (Gibco) en HBSS a 37 °C durante 30 min para favorecer la separación de dermis y epidermis. La dermis se seleccionó con ayuda de pinzas y se dividió en pequeñas fracciones para obtener los explantes. Éstos se colocaron en pocillos de placas de 6 pocillos (MW-6, del inglés *multi well*) pre-tratadas con gelatina al 0.1% (p/v) (Panreac AppliChem) y se cultivaron con medio DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Lonza), conteniendo 4.5 g/L de glucosa, suplementado con un 20% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Gibco), 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 1% (v/v) de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina; Lonza) y 1% (v/v) de antifúngicos (Anfotericina B; Invitrogen), a 37 °C y con un 5% de CO₂ (Fig. 7).

Pacientes	Genética	Género	Edad	Clínica
Sujetos control				
C2*	wt/wt	F	66	-
C3*	wt/wt	M	72	-
C4**	wt/wt	M	72	-
C5**	wt/wt	F	63	-
C6**	wt/wt	F	71	-
C8 #	wt/wt	M	55	-
C9 #	wt/wt	F	59	-
C10 #	wt/wt	M	59	-
C11 #	wt/wt	F	55	-
C12 #	wt/wt	F	52	-
Pacientes con enfermedad de Parkinson y mutación en <i>GBA1</i>				
PD1*	N370S/wt	F	67	Sin deterioro cognitivo
PD2*	N370S/wt	F	75	Demencia moderada
PD3**	N370S/wt	M	69	Síntomas motores. Disminución cognitiva
PD4**	N370S/wt	F	59	Síntomas motores. Sin deterioro cognitivo
PD5*	L444P/wt	H	74	Demencia
PD6***	L444P/wt	F	63	Síntomas motores. Sin deterioro cognitivo
PD7***	L444P/wt	M	75	Síntomas motores. Discinesias. Sin deterioro cognitivo
PD8***	L444P/wt	M	55	Síntomas motores. Sin deterioro cognitivo
PD9***	L444P/wt	M	58	Síntomas motores. Sin deterioro cognitivo
Pacientes con enfermedad de Gaucher				
Paciente GD1**	L444P/L444P	M	7	Hepatoesplenomegalia severa, pérdida auditiva neurosensorial bilateral
Paciente GD2**	L444P/L444P	M	1	Hepatoesplenomegalia severa, estrabismo, y disfagia

Tabla 2. Principales características genéticas y fenotípicas de los pacientes parkinsonianos y sujetos control. * Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; ** Coriell Cell Repositories; *** Hospital Virgen del Rocío, Sevilla; # Clínica Fernández Blanco, Madrid; PD, del inglés, *Parkinson disease*; GD, del inglés, *Gaucher disease*.

1.2. Cultivo y mantenimiento de los fibroblastos humanos

Una vez obtenidos los fibroblastos del explante, el cultivo se mantuvo con medio DMEM suplementado con un 10% (v/v) de FBS y 1% (v/v) de antibióticos a 37 °C y con un 5% de CO₂. Todos los experimentos se llevaron a cabo con fibroblastos que no superaban el pase 8. Tanto las líneas de los sujetos control como las de los mutantes se crecieron en paralelo. Dependiendo del experimento, el medio de cultivo se modificó con diferentes tratamientos que se recogen en la tabla 3.

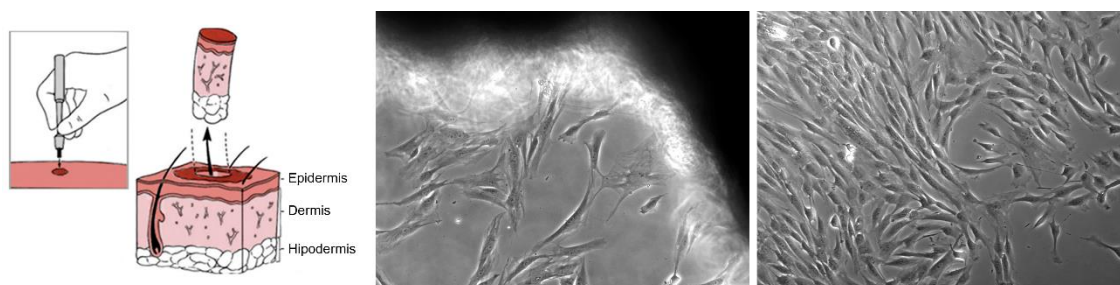


Figura 7. Imágenes representativas de la obtención de los fibroblastos mediante la técnica del explante

2. Extracción de ADN y secuenciación

El primer paso para llevar a cabo nuestros estudios fue confirmar la presencia de las mutaciones (L444P o N370S) en el gen *GBA1* en los fibroblastos obtenidos. Para ello, los fibroblastos se sembraron en placas de cultivo a una densidad celular de $1.2-1.5 \times 10^4$ células/cm², y a las 24 h se extrajo el ADN total con el kit Illustra genomicPrep Mini spin (GE Healthcare). La secuenciación de cada grupo de fibroblastos se realizó en el Centro Nacional de Genotipado (CeGEN) en Santiago de Compostela, usando la tecnología Sequenom a partir del ADN obtenido.

3. Western blot

Los lisados celulares utilizados para los ensayos de Western blot (WB) se obtuvieron con el tampón de lisis (20 mM Tris/HCl, 140 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mM MgAc, 20 mM β -Glicerofosfato, 20 mM Na₂MoO₄, 0.2 mM Na₃VO₄, 0.5% (v/v) Tritón x-100, 1 mM DTT, 2 mM benzamidina, 10 μ g/ μ L leupeptina, 10 μ g/ μ L antipaína, 10 μ g/ μ L pepstatina) y la concentración de proteínas se cuantificó usando el método BCA (del inglés, *Bicinchoninic Acid Kit*, Sigma). Se cargaron 12 μ g de proteína de los lisados en los

geles de acrilamida-SDS de electroforesis con un porcentaje de acrilamida entre 6.5-15%, dependiendo del peso molecular de las proteínas a detectar. A continuación, se llevó a cabo la transferencia de tipo semi-seca (Trans-Blot Turbo, BioRad) a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare). Los anticuerpos primarios utilizados en el proceso de inmunodetección se muestran en la tabla 4. Después, las membranas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP-*conjugated*, Vector) o con los fluoróforos IR-680/800 (LI-COR Biosciences). Por último, las bandas correspondientes se detectaron por quimioluminiscencia (anticuerpos HRP) o mediante la tecnología Odyssey® CLx (*Infrared Imaging System*, LI-COR Biosciences). Las proteínas β -Actina o β -Tubulina fueron utilizadas como control de carga.

Tratamiento	Acción/Efecto	Dosis	Casa comercial
Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)	Privación de nutrientes Induce autofagia	-	Sigma
Bafilomicina-A1	Bloquea fusión del lisosoma con el autofagosoma	100 nM	Sigma
Rapamicina	Induce autofagia	500 nM	Sigma
Cloroquina	Induce citotoxicidad y fosfolipodosis	50 μ M	Sigma
tert-butil hidroperoxido (tBHP)	Induce estrés oxidativo	100 μ M	Sigma
Lactacistina	Inhibe actividad proteasoma	10 μ M	Calbiochen

Tabla 3. Tratamientos utilizados en los diferentes experimentos.

4. Tratamiento con endoglicosidasa-H

Los lisados celulares (30 μ g) de procedentes de cada tipo de fibroblasto se desnaturalizaron con la solución de desnaturalización de glicoproteínas (New England Biolabs) a 100 °C. Después el lisado fue incubado con 1 μ l de la enzima endoglicosidasa-H (endo-H) o péptido-N-glicosidasa-F (PNGasa-F) (New England Biolabs) en muestras

independientes y con sus respectivas soluciones de reacción, durante toda la noche a 37 °C. Finalmente, las muestras ya digeridas se utilizaron para la realización de los correspondientes experimentos de WB.

5. Inmunocitoquímica

Los fibroblastos se cultivaron en cubreobjetos pre-tratados con gelatina al 0.1% (p/v) y posteriormente fijados con paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v) o con metanol. Los anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de inmunocitoquímica se muestran en la tabla 4. Después, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488 o 594 (Invitrogen). Finalmente, los núcleos fueron teñidos con el colorante DAPI (Invitrogen) y montados en portaobjetos con el medio de montaje Prolong® Gold (Life Technologies). Las muestras fueron examinadas mediante un microscopio confocal (AF 6500-7000, Leica).

ANTICUERPO	CONCENTRACIÓN	FABRICANTE
Western Blot		
β -Actina	1:30.000	Sigma
β -tubulina	1:2.000	Sigma
Beclina	1:1.000	Santa Cruz
Calnexina	1:500	Santa Cruz
Catepsina B	1:1.000	Sigma
Catepsina D	1:1.000	Sigma
CHOP	1:500	Santa Cruz
LAMP1	1:500	GenTex
LC3B	1:5.000	Sigma
Glucocerebrosidasa1	1:1.000	Sigma
P62/SQSTM1	1:1.000	Abnova
SOD1	1:1.000	Rockland
p-mTOR	1:1.000	Cell Signaling
Inmunocitoquímica		
Calnexina	1:50	Santa Cruz
Glucocerebrosidasa1	1:200	Sigma
LAMP1	1:400	Santa Cruz
P62/SQSTM1	1:200	Progen

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de Western blot y de inmunocitoquímica.

6. RT-PCR cuantitativa

Las determinaciones por RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) cuantitativa se realizaron en la unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid a partir del ARN total extraído con el kit Illustra RNAspin (GE Healthcare). La qRT-PCR se realizó con el sistema de detección SYBER Green (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) y los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla 5. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores obtenidos se normalizaron frente a los niveles de ARNm de GAPDH, usando el método de doble delta Ct (Livak y Schmittgen, 2001).

Gen	Oligonucleótido <i>Forward</i>	Oligonucleótido <i>Reverse</i>
<i>GAPDH</i>	5'-GTCGGAGTCAACGGATT-3'	5'-AAGCTTCCCGTTCTCAG-3'
<i>GBA1</i>	5'-CCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAG-3'	5'-CCCGTGTGATTAGCCTGGAT-3'
<i>PERK</i>	5'-GAGCTGTCGGACCTCGAGTG-3'	5'-GGCAGCTTCCTGTTCTTCCACATCTG-3'
<i>ATF6</i>	5'-TGCTT CAGCACACCAAGACTC-3'	5'-CCCAGCAACAGCAAGGACTGGC-3'
<i>CHOP</i>	5'-ACCAAGGGAGAACCAGGAAACG-3'	5'-TCACCATTCCGGTCAATCAGAGC-3'
<i>BiP</i>	5'-GCCTGTATTTCTAGACC GCC-3'	5'-TTCATCTTGCCAGCCAGTTG-3'
<i>SOD1</i>	5'-GCACTAGCAGCATGTTGAGC-3'	5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3'
<i>CAT</i>	5'-TTTCCCAGGAAGATCCTGAC-3'	5'-ACCTTGGTGAGATCGAATGG-3'

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de RT-PCR

7. Tinciones celulares

7.1. LysoTracker®/Filipin III

El estudio de la masa lisosomal se llevó a cabo usando el compuesto LysoTracker® Red DND-99 (Life Technologies), ya que éste es un fluoróforo permeable a las membranas celulares y tiñe los compartimentos ácidos de células vivas (lisosomas y autofagolisosomas). Los fibroblastos se cultivaron en placas provistas de cubreobjetos de vidrio pre-tratados con gelatina al 0.1% (p/v). El experimento se realizó en condiciones basales y con los tratamientos correspondientes. A continuación, los fibroblastos se incubaron con el LysoTracker® a una concentración de 70 nM durante 30 min a 37 °C y, posteriormente, se fijaron con PFA al 4% (p/v). Después, en los casos que procedía, se llevó a cabo una tinción el colorante Filipin III (Sigma) a una concentración de 25 µg/mL para la detección del colesterol libre. Finalmente, los cubreobjetos se montaron con el medio de montaje Prolong® Gold para proceder a la adquisición de las imágenes de fluorescencia.

7.2. Cytopainter

Para el estudio de la morfología del AG y del RE, se utilizó la tinción Golgi/ER Staining Kit - Cytopainter (Abcam). Las células se cultivaron en micro-cámaras de 8 pocillos (Ibidi) a una densidad celular de 8.000 células/pocillo para después incubarse con 100 μ L del reactivo conteniendo los colorantes específicos para el AG, el RE y el núcleo durante 30 min a 4 °C y protegido de la luz, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se adquirieron imágenes *in vivo* en un microscopio confocal invertido (SP5, Leica) con el objetivo de 63X.

8. Actividad enzimas lisosomales

El análisis de la actividad de diferentes enzimas lisosomales se llevó a cabo mediante las técnicas de fluorimetría o citometría de flujo, según correspondía. En primer lugar, la actividad de las enzimas GCasa1 y GCasa2, β -galactosidasa (β -Gal) y β -hexaminidasa A (β -HexA) se midió por fluorimetría utilizando el compuesto 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (4-MUG), methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside (4-MU- β Glc) y 4-methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside (4-MU β Gal) (Sigma), respectivamente. Estas actividades enzimáticas se determinaron como describió previamente Schöndorf et al., 2014. Brevemente, las células se lavaron dos veces con PBS frío, se rasparon y se lisaron en la solución Mcllvaine (0.1 M ácido cítrico/0.2 M fosfato sódico) a pH 5.2 para las GCasas o a pH 4.4 para la β -Gal y β -HexA. La cantidad de proteína total se midió utilizando el ensayo de BCA. Los lisados celulares se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos y el ensayo enzimático se llevó a cabo por triplicado. Por un lado, las actividades de las enzimas β -Gal y β -HexA se midieron en la solución Mcllvaine con 0.56 mM de 4-MU- β Gal y 1 mM de 4-MUG a pH 4.3 y 4.1, respectivamente. En el caso de las actividades la GCasa1 y GCasa2, se determinaron con la solución Mcllvaine a pH 5.2 en presencia de 0.25 mM conuritol- β -epóxide (CBE, Calbiochem), inhibidor de GCasa1, o del inhibidor de GCasa2, AMP- desoxinojirimicina (5 μ M AMP-DNM, Cayman Chemical). Las reacciones se incubaron 1 h a 37 °C. Posteriormente, la fluorescencia se analizó tras añadir una solución conteniendo glicina 0.2 M (pH 10.7) para detener la reacción. La 4-metilumbeliferona (4-MU) escindida se midió usando una λ_{ex} = 365 nm y λ_{em} = 445 nm en el lector de placas de fluorescencia FLUOstar Omega (BMG LABTECH) y una curva estándar. La actividad total de la GCasa1

y de la GCasa2 fue obtenida restando la actividad de la GCasa2 a la GCasa1 y viceversa. Los datos se calcularon como pmoles de sustrato convertido por mg de proteína y h.

El análisis de la actividad de la enzima Catepsina B (CatB), se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los fibroblastos se cultivaron en placas MW-6 a una densidad de 0.5×10^6 células/pocillo y al día siguiente, se llevó a cabo el experimento de citometría. Las células se incubaron con la sonda Magic Red™ Cathepsin B (Immunochemistry Technologies) en una proporción de 1:26, siguiendo las instrucciones del fabricante (λ_{ex} = 592 nm, λ_{em} = 628 nm) durante 1 h a 37 °C en oscuridad. La sonda penetra fácilmente la membrana celular y las membranas de los orgánulos. Si la enzima CatB está activa, el sustrato Magic Red se escinde generando un producto que se volverá fluorescente tras la excitación. Finalmente, se analizó la intensidad de la señal de fluorescencia de 10.000 células/muestra en el citómetro FACS Aria I (BD Biosciences).

9. Estrés oxidativo y viabilidad

9.1. Especies reactivas de oxígeno

Para determinar el grado de estrés oxidativo en los fibroblastos, se utilizaron dos sondas para detectar los niveles de peróxidos y de anión superóxido por citometría de flujo. Por un lado, para medir la cantidad de peróxidos en las células, éstas se incubaron con la sonda CM-H2DCFDA (clorometil-2',7-diclorodihidrofluoresceína diacetato; Invitrogen), también denominada fluoresceína (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 590 nm) a una concentración de 0.5 μ M durante 30 min a 37 °C. El H2DCFDA es un compuesto permeable a la membrana plasmática. En el interior de las células, las esterasas citoplasmáticas no específicas escinden el diacetato, quedando libre la molécula de dihidrodiclorofluoresceína. En presencia de peróxidos y actividad peroxidasa, esta molécula se oxida a diclorofluoresceína (DCF) que es fluorescente. Por otro lado, para la detección de los niveles de anión superóxido se utilizó la sonda DHE (dihidroetidio; Invitrogen) a una concentración de 2 μ M (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 525 nm) durante 30 min a 37 °C. Si las células presentan estrés oxidativo, este compuesto se oxida dando lugar a bromuro de etidio e intercalándose en el ADN. Tanto la fluoresceína como el anión superóxido fueron medidos en condiciones basales y tras el tratamiento con 100 μ M de tert-butil hidroperóxido, (tBHP, Luperox® TBH70X, Sigma) como estímulo de estrés

oxidativo. En ambos casos las células se cultivaron a una densidad celular de 0.5×10^6 células/pocillo en placas MW-6 y se analizaron un mínimo de 10.000 células/muestra en el citómetro de flujo (BD FACS Canto II; BD Biosciences).

9.2. Apoptosis

La viabilidad celular de los fibroblastos se evaluó mediante los ensayos de Anexina V-FICT/yoduro de propidio (IP), que permite determinar el tipo de muerte celular que se está produciendo (apoptosis o necrosis) midiendo cambios en las propiedades de la membrana celular. En las células viables hay una distribución asimétrica de fosfolípidos en la membrana: fosfatidilcolina y esfingomielina se localizan en la cara externa de la membrana mientras que la fosfatidilserina lo hace en la cara interna. En las células apoptóticas, la fosfatidilserina pasa a estar en la capa externa de la membrana, lo que facilita la unión específica de Anexina V conjugada con fluoresceína (FICT; InmunoStep) a este fosfolípido, en una interacción que es dependiente de calcio. Sin embargo, cuando las células mueren por necrosis, se pierde la integridad de la membrana plasmática, lo que imposibilita la unión de Anexina V a estas células.

La combinación de Anexina V-FITC y el marcador catiónico IP (Sigma) permite distinguir entre células en apoptosis y células muertas. El IP es una molécula fluorescente usada para estudiar muerte celular ya que actúa como agente intercalante en el ADN de células muertas o en apoptosis tardía. En estos estadíos, las membranas plasmática y nuclear de las células se vuelven completamente permeables, lo que facilita la entrada de este agente en el interior celular.

Los fibroblastos se cultivaron en placas MW-6 a una densidad celular de 0.5×10^6 células/pocillo. Al día siguiente, las células se incubaron 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad con la sonda Anexina V ($5 \mu\text{L}$ por muestra) y después se añadió $1 \mu\text{L}$ de IP (1 mg/ml). Posteriormente, los niveles de fluorescencia se cuantificaron analizando un mínimo de 10.000 células/muestra con el citómetro de flujo (BD FACS Canto II; BD Biosciences).

10. Lentivirus

En esta tesis se utilizaron dos tipos de partículas lentivirales. Una de ellas se utilizó para el análisis del estudio del flujo autofágico, y la otra para el análisis de la estructura de la red mitocondrial.

10.1. Plásmidos

En primer lugar, se utilizó el plásmido pWPI-LC3B-GFP para generar lentivirus que permiten la visualización de los autofagosomas en los fibroblastos, ya que la proteína LC3B es un marcador de autofagosomas. Los fibroblastos infectados con este lentivirus expresan la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de la proteína LC3B.

Para el análisis de la complejidad de la red mitocondrial se utilizó el plásmido pWPXL-mtDsRed (Clayton *et al.*, 2012), proporcionado por el Dr. Ramón Trullas (Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona). Las construcciones en el vector lentiviral pWPXL contienen una secuencia diana de la subunidad IV de la proteína mitocondrial citocromo oxidasa.

10.2. Producción de lentivirus

Para la obtención de los lentivirus conteniendo los plásmidos LC3B-GFP o mtDsRed, se utilizó la línea celular HEK293T. Estas células se cultivaron en placas de plástico de 100 mm a una densidad de 4×10^6 células/placa. Al día siguiente, se transfectaron con cloruro cálcico (CaCl_2) y 30 μg de ADN total de la mezcla de plásmidos pMD2.G de la envoltura viral, psPAX2 de la cápside y plásmido de interés en una relación 1:2:3, respectivamente. Tras 16 h, se procedió a cambiar el medio de cultivo con los componentes de la transfección por medio fresco. Después, el medio conteniendo las partículas lentivirales fue recogido en dos ocasiones, tras 8 y 16 h después de haber retirado el medio de la transfección. Se realizaron fotografías en fluorescencia antes de la primera recogida como control visual de la eficiencia de la transfección (Fig. 8). Finalmente, el medio se ultracentrifugó a 20.000 rpm y 16 °C. El *pellet* se resuspendió en PBS, se alicuotó y se procedió a realizar la titulación (estimación del número de unidades infecciosas).

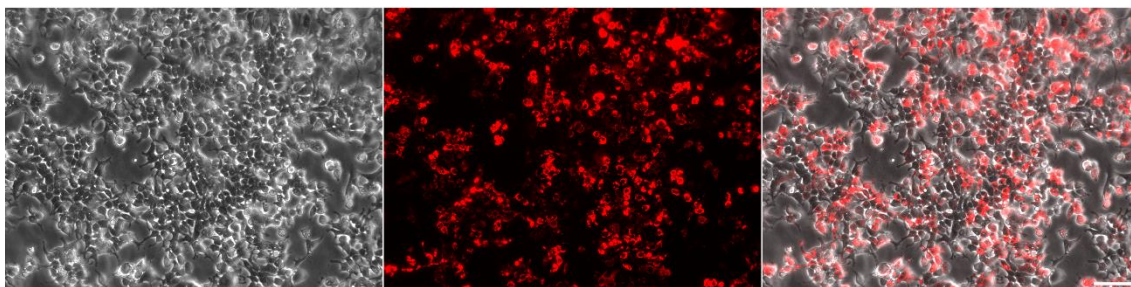


Figura 8: Células HEK293T tras 24 h después de la transfección con el plásmido pWPXL-mDsRed. Las imágenes fueron tomadas en contraste de fase y fluorescencia. Barra de escala: 100 μm .

10.3. Titulación

La titulación de las partículas lentivirales fue realizada usando los fibroblastos humanos a través de la cuantificación del número de integraciones de material genético lentiviral/célula. Esto se llevó a cabo mediante la amplificación por qRT-PCR del gen WPRE presente en el vector lentiviral y del gen TBP1 como control interno de los fibroblastos. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 2.000 células/ cm^2 en ocho pocillos y después se procedió a realizar la transducción usando diluciones seriadas: 10 μL , 5 μL , 2.5 μL , 1.25 μL , 0.6 μL , 0.3 μL , 0.15 μL y 0.08 μL . Los fibroblastos se incubaron con los lentivirus durante 36 h, después el cultivo celular se lisó con la solución DireCtQuant 100T y, finalmente, se procedió a realizar la qRT-PCR. Además de los lisados celulares, también se utilizaron muestras estándar con el número de integraciones medidas por PCR digital, proporcionadas por el Dr. Ramón Trullas. Para conocer el número de integraciones de las partículas lentivirales en los fibroblastos humanos, se realizó un análisis de regresión entre los datos obtenidos de los estándares y el volumen de lentivirus usado en la transducción de los fibroblastos. De esta manera, se pudo calcular el volumen de lentivirus óptimo para los experimentos de transducción.

10.4. Selección de los fibroblastos LC3B-GFP positivos (*sorting*)

Con el fin de conseguir una población exclusiva de fibroblastos que sobreexpresen la proteína LC3B-GFP, se realizó una selección de cada línea celular por citometría de flujo o *sorting*. Tres días después de la transducción, las células vivas se examinaron con un clitómetro de flujo y se seleccionaron los fibroblastos positivos para LC3B-GFP mediante el sistema FACS (del inglés, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Las células recogidas fueron sembradas de nuevo para expandir el cultivo. Después, estos

fibroblastos LC3B-GFP positivos se cultivaron en cubreobjetos de vidrio pre-tratados con gelatina al 0,1% (p/v) y se realizaron los tratamientos correspondientes para la inducción o inhibición de la autofagia. Finalmente, las células se fijaron con PFA al 4% (p/v) durante 30 min, se hizo una contratinción con DAPI y se montaron en portaobjetos con el medio de montaje Prolong® Gold para tomar imágenes con microscopía de fluorescencia (Leica).

11. Análisis de la estructura de la red mitocondrial celular

Una vez obtenidos los datos de la titulación, se cultivaron los fibroblastos en cubreobjetos de vidrio pre-tratados con gelatina 0,1% (p/v) a una densidad de 2.000 células/cm² y 4-6 h después se procedió a la transducción con las partículas lentivirales conteniendo el plásmido pWPXL-mtDsRed. Finalmente, 36 h después de la transducción, las células fueron fijadas con PFA 4% (p/v), se montaron en portaobjetos con el medio de montaje Prolong Gold y fueron examinadas bajo el microscopio confocal.

12. Análisis de las imágenes de fluorescencia

12.1. Intensidad de la señal de fluorescencia

Los niveles de fluorescencia de las sondas LysoTracker® y Filipin III, así como la señal de la sobreexpresión de la proteína LC3B-GFP fueron analizadas con el programa informático ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). En primer lugar las imágenes se convirtieron a escala de grises, se sustrajo el fondo y se dibujó el contorno de cada célula para obtener el valor de su área. Finalmente, la señal de fluorescencia se fijó a un umbral que ajustaba las regiones que estaban intensamente teñidas dentro de los límites celulares individuales para así calcular los valores de intensidad integrada (IntDen; intensidad de la señal de fluorescencia en el área de marcaje dividido por el área total de la célula). La cuantificación de Filipin III dentro de los orgánulos positivos para LysoTracker® se realizó tal y como describió (Linder *et al.*, 2007). Se superpuso una máscara del área de la señal de LysoTracker® sobre las imágenes de Filipin III y posteriormente se determinó la intensidad integrada de Filipin III. Se analizaron un mínimo de 100 células de cada condición y en cada experimento y todos los datos se normalizaron con respecto a los sujetos control.

12.2. Colocalización

Las imágenes de los experimentos de inmunocitoquímica doble de GCasa1/LAMP1 se adquirieron con un microscopio confocal SP5 usando el objetivo de 63X y un zoom digital de 3,5X. El procesamiento y el análisis de las imágenes se llevaron a cabo con el software confocal de Leica y gracias a un *plugin* de colocalización de ImageJ para calcular el coeficiente de Pearson (PCC). El análisis de colocalización se realizó utilizando una región de interés (ROI) por cada célula y en un mínimo de 100 células por cada condición y experimento.

12.3. Morfología de la red mitocondrial

Para realizar el estudio de la estructura mitocondrial se tomaron imágenes en un microscopio confocal Leica SP5 con el objetivo de 63X y un zoom digital de 3.5X. Se adquirieron 7 imágenes a lo largo del eje Z con una separación entre cada imagen de 0.5 μm . Después, la proyección máxima de cada imagen se procesó con el programa informático Fiji a través del *plugin* MiNA (Valente *et al.*, 2017) del que se obtienen directamente los valores de los diferentes parámetros estudiados. El área analizada en cada imagen corresponde a una ROI de 150x150 píxeles situado en una región perinuclear de la célula.

13. Microscopía electrónica

Las células se cultivaron en placas de 100 mm con una densidad de 10^6 células por placa. Después, se fijaron con PFA al 4% (p/v) y 2,5% de glutaraldehído (v/v) (pH 7.4) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con PB 1X y se trataron con tetraóxido de osmio al 1% (v/v) durante 30 min. A continuación, los fibroblastos fueron deshidratados con una batería de etanoles (30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%) antes de ser embebidas en resina Durcupan™ ACM (Sigma), pasándose por una mezcla de etanol:resina (1:1, v/v) durante 20 min para finalmente pasar a la resina pura que se dejó polimerizar durante dos días a 57 °C en una estufa. Una vez polimeriza la resina, las muestras fueron llevadas al servicio de Microscopía Electrónica del Instituto Cajal. Se obtuvieron secciones ultrafinas (60-70 nm) con un ultramicrotomo (Leica Microsystems), que fueron marcadas con citrato y uranil acetato y examinadas mediante un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1200 EX-II). Para cuantificar

los cuerpos multilamelares (CML) se usó el programa informático ImageJ como (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2010). Se registraron 50 fotografías de diferentes áreas de un mínimo de 6 células por sujeto experimental con un aumento de 20.000X. Los CML se identificaron mediante la inspección visual de las micrografías utilizando criterios previamente establecidos (Parkinson-Lawrence *et al.*, 2010). Los resultados se expresaron como número de estructuras por célula.

14. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa informático GraphPad Prism 6.0. Para evaluar la distribución de los datos se aplicó la prueba D'Agostino & Pearson. Se utilizaron los tests paramétricos ANOVA de una o dos vías seguido seguidos del post-hoc de Bonferroni para la comparación entre las diferentes líneas de fibroblastos en condiciones basales o en los experimentos donde se utiliza algún tratamiento, respectivamente. En los casos en los que los datos no presentaban una distribución normal, se utilizó el test no paramétrico Kruskal–Wallis seguido del post-hoc de Dunn. Las proporciones de células que muestran aparato de Golgi fragmentado se analizaron mediante la prueba de χ^2 , mientras que las posibles diferencias en la complejidad de la red mitocondrial se analizaron mediante un t-test. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM).

Resultados

1. Las mutaciones N370S y L444P en heterocigosis en el gen *GBA1* disminuyen la expresión de GCasa1 sin alterar la transcripción

En primer lugar, con el objeto de confirmar que los fibroblastos humanos conservan la misma mutación del paciente del que proceden, se analizó la presencia de las mutaciones N370S o L444P del gen *GBA1* que codifica la enzima GCasa1 en todos los grupos celulares. La secuenciación se realizó en el Centro Nacional de Genotipado en Santiago de Compostela, con muestras de ADN total de cada grupo de fibroblastos. Se confirmó la presencia de las mutaciones en heterocigosis en los pacientes parkinsonianos así como su ausencia en los sujetos control (Fig. 9).

Alelo	ADNc	(a) Proteína	(b) Exon
N370S	c.1226 A>G	p. Asn409Ser	9
L444P	c.1448 T>C	p. Leu483Pro	10
(a) Secuencia de ADNc depositada en la secuencia de referencia de Genbank NM_001005749			
(b) Proteína codificada por el primer marco de lectura			

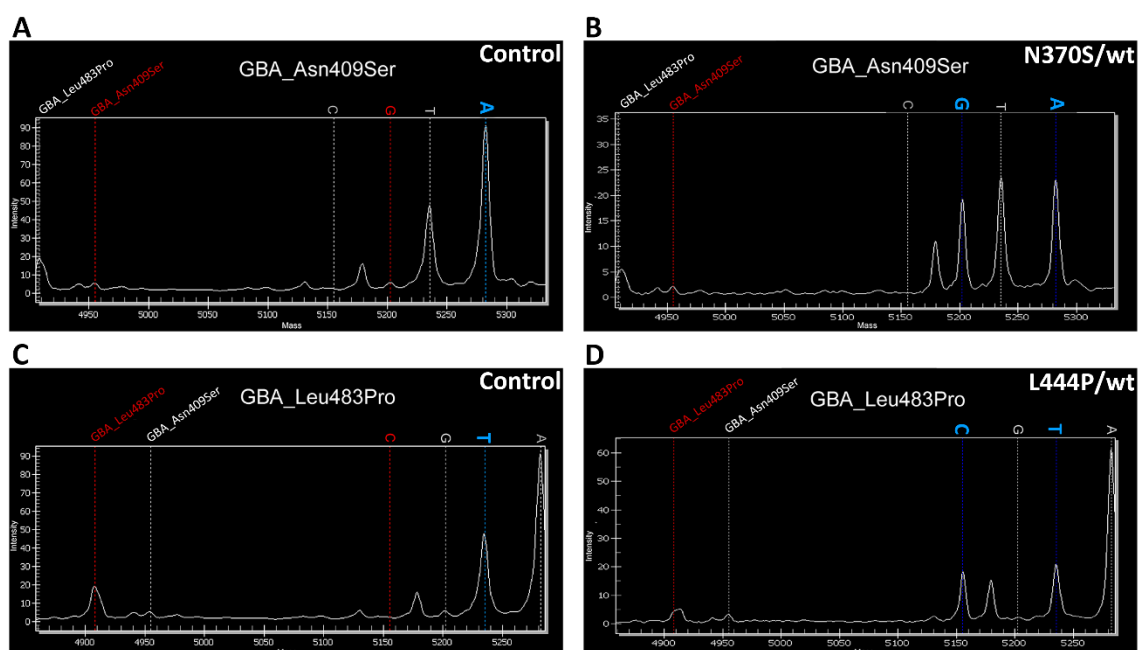


Figura 9. Espectrofotometría de masas para la detección de las mutaciones en el gen *GBA1*. Se utilizó la tecnología Sequenom para la detección de las mutaciones N370S y L444P en los fibroblastos procedentes de pacientes parkinsonianos. En el perfil se representa la abundancia relativa de las bases complementarias en esa posición para los dos alelos (eje X: masa de nucleótidos en una; eje Y: intensidad del marcaje para la base). (A, C) Las muestras control presentan un pico para cada alelo (la masa 5282 corresponde con una A y 5232 corresponde a una T, (marcadas en azul). (B, D) La espectrofotometría para las muestras que contienen las mutaciones N370S o L444P en heterocigosis muestra dos picos marcados con A y G en las posiciones 5202 y 5280 para la mutación N370S (B), y con T y C en las posiciones 5155 y 5232 para la mutación L444P (D), respectivamente.

A continuación, se determinó cómo afectaban estas mutaciones a la expresión de la proteína GCasa1, para ello se utilizó la técnica de WB. Los resultados obtenidos muestran que ambas mutaciones producen una disminución significativa de los niveles de GCasa1 (Fig. 10A y B). Además, cabe destacar que los fibroblastos L444P tienen significativamente menos cantidad de GCasa1 que los N370S. También se determinó la actividad de la enzima, encontrando que, al igual que ocurre con los niveles de proteína, está significativamente disminuida en los fibroblastos mutantes (Fig. 10C). En cambio, no se detectaron diferencias entre los dos tipos de fibroblastos mutantes, a pesar de los niveles más bajos de proteína GCasa1 en las células L444P. Con el fin de determinar si la disminución se debe a defectos en la transcripción, se realizó una qRT-PCR para *GBA1* utilizando ARN mensajero (ARNm) extraído de los fibroblastos. Como se observa en la Fig. 10D, tanto los fibroblastos N370S como los L444P presentan niveles similares de ARNm a los encontrados en los fibroblastos control, indicando que el proceso de transcripción se lleva a cabo correctamente. Por tanto, es posible que los niveles bajos de GCasa1 en las células mutantes se deban a un fallo en la traducción de la proteína, a cambios en la vida media de la proteína o a una alteración posterior del proceso de maduración.

2. Las mutaciones en *GBA1* aumentan la retención de la GCasa1 en el retículo endoplásmico

Debido a que el descenso de los niveles de GCasa1 no se debe a la transcripción, determinamos si estas mutaciones afectaban al proceso de maduración de la GCasa1 y a su localización en los lisosomas (su destino final). Para ello, se estudió su localización intracelular mediante experimentos de inmunocitoquímica. En primer lugar, utilizamos el anticuerpo contra la GCasa1 en combinación con el de LAMP1 (proteína de la membrana lisosomal). Como podemos observar en la Fig. 11A, la señal de la GCasa1 en los fibroblastos control se visualiza como un punteado específico, ocupando gran parte de la superficie del citoplasma y esta señal colocaliza con el marcaje de LAMP1. Esto indica que la GCasa1 se ha procesado correctamente y ha alcanzado su destino final. En cambio, en los fibroblastos procedentes de pacientes con la EG, la GCasa1 se encuentra dispersa y prácticamente no colocaliza con LAMP1 (Fig. 11A). Esto sugiere que la mayor

parte de la enzima no se encuentra en los lisosomas, sino que queda, probablemente, retenida en el RE. Sin embargo, en los fibroblastos con mutaciones en heterocigosis se observa un fenotipo intermedio entre las células control y las procedentes de pacientes con la EG. Una parte colocaliza con LAMP1 y el resto no, como se confirma en los perfiles de intensidad de fluorescencia (Fig. 11B). Para la cuantificación del grado de colocalización entre GCasa1 y LAMP1 se utilizó el coeficiente de Pearson (PCC). Observamos que ambas mutaciones en heterocigosis muestran un descenso significativo del PCC en comparación con los controles (Fig. 11C). Esta disminución del grado de colocalización entre las proteínas GCasa1 y LAMP1 podría indicar que parte de la GCasa1 queda retenida en el RE. En este orgánulo tiene lugar la maduración y el plegamiento de las proteínas, por lo que un fallo en estos procesos podría impedir que la GCasa1 alcanzara su destino final.

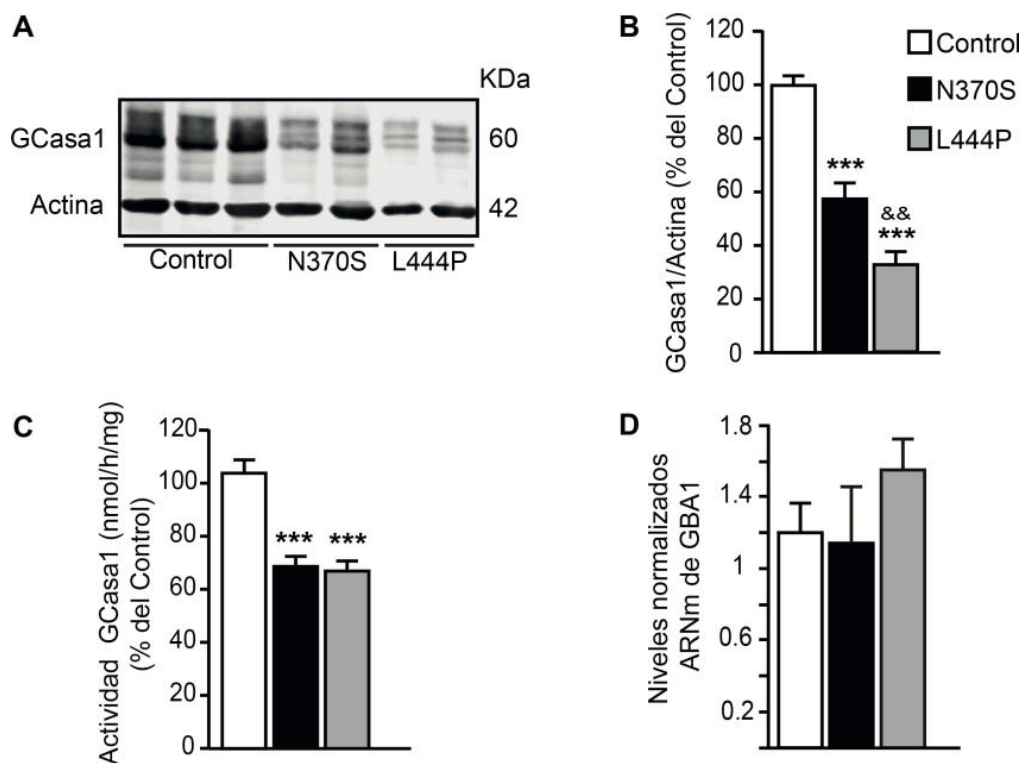


Figura 10. Las mutaciones en *GBA1* disminuyen la expresión y la actividad de la enzima GCasa1 en fibroblastos humanos. Los paneles muestran un western blot (WB) representativo de GCasa1 (A) y su cuantificación (B), con niveles significativamente menores en los mutantes. (C) La actividad de la enzima GCasa1 está disminuida a diferencia del ARNm (D), donde no hay cambios entre controles y mutantes. Los datos representan la media \pm s.e.m de al menos tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. *** $P < 0.001$ vs controles; && $P < 0.01$ vs N370S. Análisis de ANOVA de una vía seguido del post-hoc Bonferroni (B) y Kruskal–Wallis seguido del post-hoc de Dunn (C y D).

Para confirmar este posible defecto en la maduración de la GCasa1, se analizó el proceso de glicosilación en las variantes N370S y L444P de la proteína. Para ello se realizó un tratamiento con las enzimas endo-H y PNGasa-F tras el cual se llevó a cabo un WB. La enzima endo-H es una endoglicosidasa específica porque distingue los oligosacáridos con cuatro o más residuos de manosa durante el proceso de N-glicosilación en el AG. Puesto que todas las estructuras posteriores son resistentes a la endo-H, con este tratamiento podemos identificar la cantidad de GCasa1 inmadura retenida en el RE ya que produce la aparición de una banda de menor peso molecular en el WB. La enzima PNGasa-F elimina todos los residuos anclados a la asparagina, por lo que sirve de control para identificar correctamente la fracción sensible a la endo-H. En los fibroblastos control, la mayor parte de la GCasa1 es resistente a la endo-H, es decir, prácticamente la totalidad de la enzima está en los lisosomas (Fig. 12A y B). En cambio, en los fibroblastos mutantes la fracción resistente a endo-H es notablemente menor, mientras que la fracción sensible es mayor que en los controles (Fig. 12A y B). Además, la fracción resistente es notablemente menor en las células L444P que en las N370S. Todo esto indica que una parte de la variante mutada de la GCasa1 queda retenida en el RE, no alcanzando los lisosomas debido a un fallo en su maduración. Por otro lado, como puede apreciarse en la gráfica de la Fig. 12B, la suma de las fracciones sensible y resistente en los fibroblastos mutantes no es igual a la suma de ambas fracciones en los controles. Para determinar si estas diferencias se deben a que parte de la GCasa1 mutante se está degradando por la vía del proteasoma, se llevó a cabo un tratamiento con Lactacistina (inhibidor proteasomal). Los resultados muestran que la Lactacistina no ejerce ningún efecto sobre los niveles de GCasa1 en los fibroblastos control ni en los N370S. Sin embargo, la cantidad de GCasa1 en los L444P incrementa significativamente tras el tratamiento con el inhibidor (Fig. 12C y D). Esto sugiere que la variante L444P de la GCasa1 se está degradando parcialmente por el proteasoma.

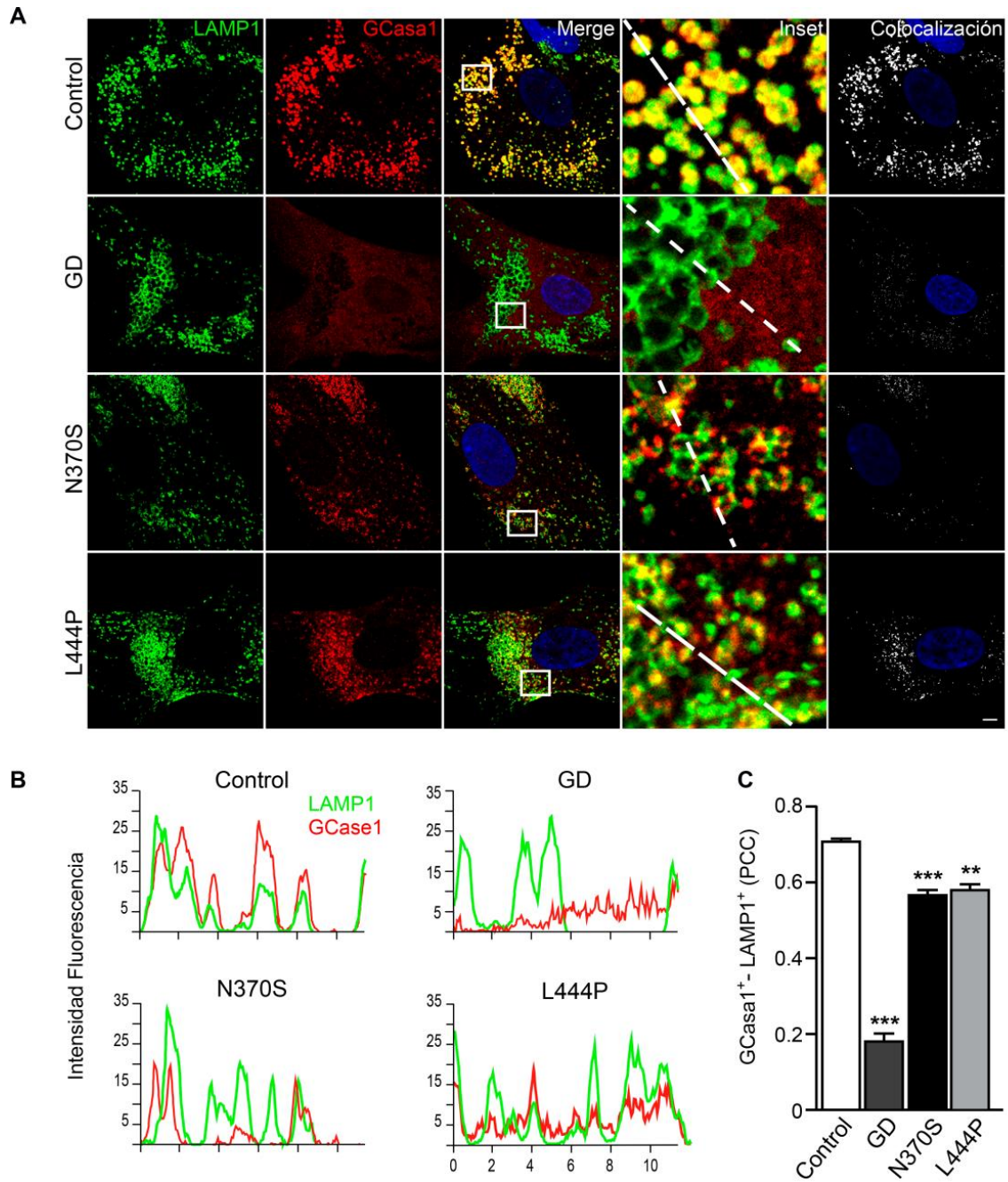


Figura 11. Las mutaciones en *GBA1* alteran la localización celular de la proteína GCase1 en fibroblastos de enfermos parkinsonianos. Inmunofluorescencia (A) y análisis de colocalización (B, C) de GCase1 (rojo) y LAMP1 (verde). Los detalles ampliados (insets) y la máscara de colocalización en el panel (A) se muestran adyacentes a las imágenes correspondientes. (B) Perfiles de intensidad analizados mediante la línea discontinua diagonal en las imágenes ampliadas. (C) Cuantificación de la colocalización entre GCase1 y LAMP1 utilizando el coeficiente de Pearson (PCC). Los datos representan la media \pm s.e.m de al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs controles. Análisis de Kruskal–Wallis seguido del post-hoc de Dunn (C). Barra de escala: 10 μ m. GD=EG.

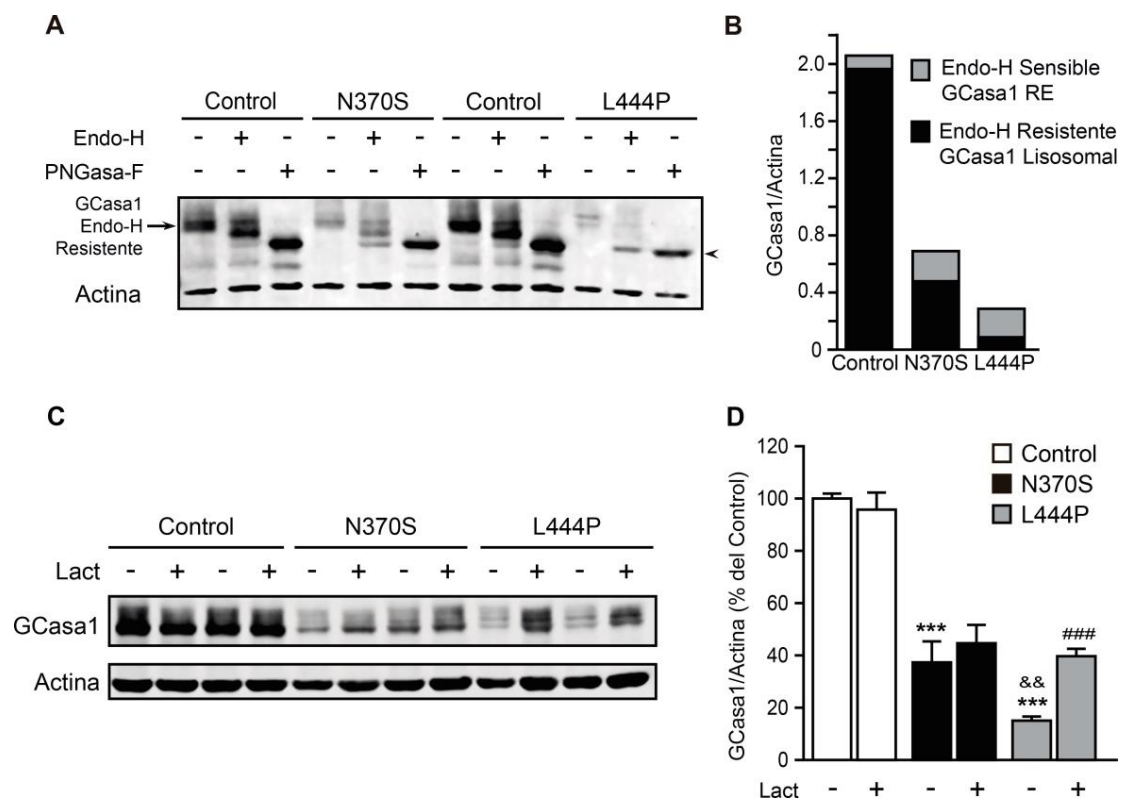


Figura 12. Los fibroblastos con mutaciones en *GBA1* tienen la proteína GCase1 retenida en el retículo endoplásmico. Los lisados celulares sometidos a estos tratamientos enzimáticos fueron analizados mediante ensayos de WB mostrando las fracciones sensibles y resistentes de la GCase1 a la endo-H. (A, B) muestran la proporción de GCase1 sensible a la enzima endo-H (bandas de menor peso molecular representando la GCase1 retenida en el RE, flecha) y su cuantificación (B). (C, D) Recuperación de los niveles de proteína de GCase1 en las células L444P pero no en las N370S después del tratamiento con Lactacistina (inhibidor del proteasoma; Lact 10 μ M, 24 h). Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. ***P < 0.001 vs controles; &&P < 0.01 vs. N370S; ###P < 0.001 vs basal de L444P. Análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-hoc Bonferroni (D).

3. Los fibroblastos con mutaciones en *GBA1* muestran estrés del retículo endoplásmico y activación de la vía UPR

Debido a que la GCase1 queda retenida de manera anormal en el RE en los fibroblastos procedentes de pacientes parkinsonianos, esto puede provocar la perturbación de la homeostasis del retículo que puede conducir al estrés del RE y activar la respuesta UPR. Para confirmar esta hipótesis, se realizaron experimentos de qRT-PCR para diferentes genes implicados en la señalización de la UPR como son *PERK*, *CHOP*, *BIP* y *ATF6* (Benbrook y Long 2012) (Fig. 13A). El ARNm de estos genes está incrementado en los fibroblastos mutantes, aunque sólo es significativo en los N370S. También se

evaluaron los niveles de las proteínas CHOP (proteína pro-apoptótica) y calnexina (chaperona del RE y marcador de estrés del RE) por WB (Fig. 13C-E). Al igual que se observa en los experimentos de qRT-PCR, en las células mutantes se produce un incremento en los niveles de estas dos proteínas, siendo sólo significativo en los fibroblastos N370S. Por otro lado, también se estudió la actividad de la GCasa2, puesto que esta enzima se encuentra en el RE (Franco *et al.*, 2018). Como se observa en la Fig. 13B, encontramos un descenso significativo en la actividad de la GCasa2 tanto en los fibroblastos N370S como en los L444P comparado con los controles.

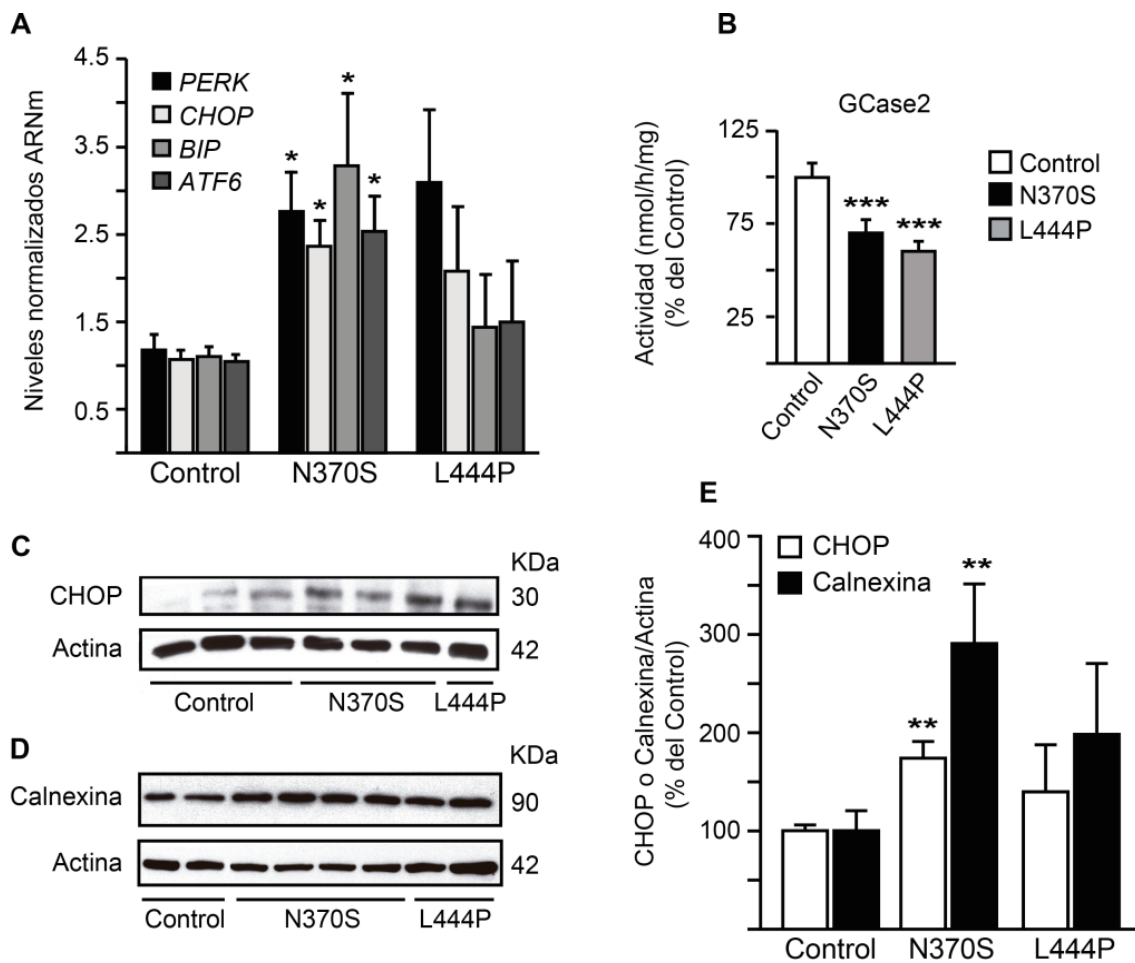


Figura 13. Las mutaciones en *GBA1* causan estrés del RE y activan la vía UPR. (A) Niveles de ARNm de marcadores de estrés del RE y de la vía UPR (*PERK*, *CHOP*, *BIP* and *ATF6*) medidos por qRT-PCR. (B) Disminución de la actividad de la enzima GCasa2 (localizada en el RE). Las proteínas CHOP (C) y calnexina (D) presentan mayores niveles en los fibroblastos N370S, determinados por WB (E). Los datos representan la media \pm s.e.m de al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs. controles. Análisis de ANOVA de una vía seguido del post-hoc Bonferroni.

Además, se realizó una inmunocitoquímica contra calnexina (Fig. 14A) donde se observa que las células control tienen la típica estructura tubular del RE (cabezas de flecha, Fig. 14A), mientras que en los fibroblastos N370S o L444P la calnexina tiene una distribución difusa, similar a la que se observa en los fibroblastos procedentes de pacientes con la EG (Fig. 14A). Estos resultados sugieren que los fibroblastos con mutaciones en *GBA1* presentan una desorganización del RE. Por otro lado, se sabe que el lumen del RE se agranda cuando hay estrés del RE (Oslowski y Urano, 2011).

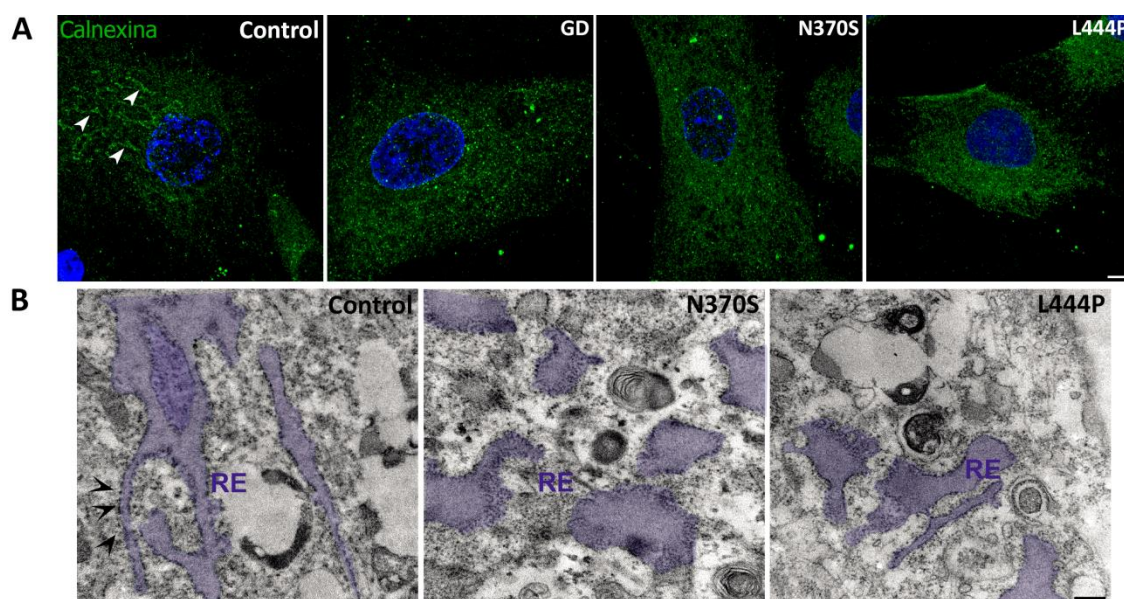


Figura 14. Las mutaciones en *GBA1* alteran la morfología del RE. La inmunocitoquímica de calnexina (A) en los fibroblastos control se ve tanto punteada como formando estructuras tubulares (puntas de flecha), mientras que ese patrón se difumina en las células mutantes. (B) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) que muestran como el RE de los fibroblastos parkinsonianos presenta alteraciones en su ultraestructura, incluyendo el engrosamiento de este orgánulo (dibujado en morado). Nótese que los ribosomas son visibles unidos a la superficie del RE. Barra de escala: 10 μ m (A), 2 μ m (B).

Para determinar si las mutaciones N370S o L444P pueden provocar este tipo de alteraciones ultraestructurales, realizamos estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET). En las imágenes de MET se observa que el RE de los fibroblastos control tiene una estructura normal, con las cisternas del RE rugoso apiladas (Fig. 14B). El lumen de estas cisternas es estrecho y en la cara externa se aprecian muchos grupos de ribosomas unidos (cabezas de flechas). Por el contrario, el RE de los fibroblastos con las mutaciones N370S o L444P se encuentra dilatado y desorganizado (Fig. 14B). Todos

estos hallazgos sugieren que las mutaciones en el gen *GBA1* desencadenan el estrés del RE y la activación de la vía UPR, lo que conduce a alteraciones estructurales del RE.

4. El aparato de Golgi de los fibroblastos con mutaciones en heterocigosis en *GBA1* presenta alteraciones morfológicas

Como vimos anteriormente, la GCasa1 mal plegada se encuentra retenida en el RE, lo que puede dar lugar no sólo a alteraciones morfológicas en el propio RE, sino también en el AG, puesto que estos orgánulos están funcionalmente relacionados (Vitale y Pedrazzini, 2017). Para analizar la morfología del AG se usó la tinción CytoPainter, que permite visualizar en diferentes canales de fluorescencia los siguientes orgánulos celulares: el AG (en verde), el RE (en rojo) y el núcleo (en azul). Las imágenes tomadas en el microscopio confocal muestran que en los fibroblastos control el AG tiene una estructura normal, es decir, se visualiza como una media luna en la zona perinuclear (Fig. 15A). En cambio, en algunos fibroblastos procedentes de pacientes parkinsonianos, el AG se encuentra fragmentado en elementos más pequeños, dispersos por el citoplasma (Fig. 15A). El análisis cuantitativo muestra que en los fibroblastos mutantes, el porcentaje de células con AG fragmentado incrementa significativamente comparado con los controles (45% en N370S, 57% en L444P y 20% en controles) (Fig. 15B). Por otro lado, con CytoPainter se observa que el RE de las células control se encuentra formando túbulos fusionados unos con otros, mientras que en las células mutantes, el RE tiene una distribución homogénea por todo el citoplasma y no se aprecian tan claramente los túbulos como en el caso de los controles (Fig. 15A). Esto confirma la morfología alterada del RE que se observaba con la inmunocitoquímica de calnexina en los fibroblastos mutantes (ver Fig. 14).

5. Las mutaciones en el gen *GBA1* alteran la vía de la autofagia

Considerando que la autofagia es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular, investigamos si esta vía está afectada por las mutaciones N370S o L444P. En primer lugar, se analizaron por WB los principales reguladores de la vía. En condiciones basales, se observa que hay un descenso en la fosforilación de la proteína mTOR en los

fibroblastos N370S, mientras que en los fibroblastos L444P no se encuentran cambios (Fig. 16A y B). Tras el tratamiento de EBSS, los niveles de p-mTOR disminuyen (puesto que p-mTOR es un inhibidor de la autofagia) tanto en las células control como en las N370S, pero no en las L444P (Fig. 16A y B). Además, la proteína Beclina1, que induce la formación de autofagosomas, aumenta significativamente tanto en los fibroblastos N370S como en los L444P (Fig. 16C y D).

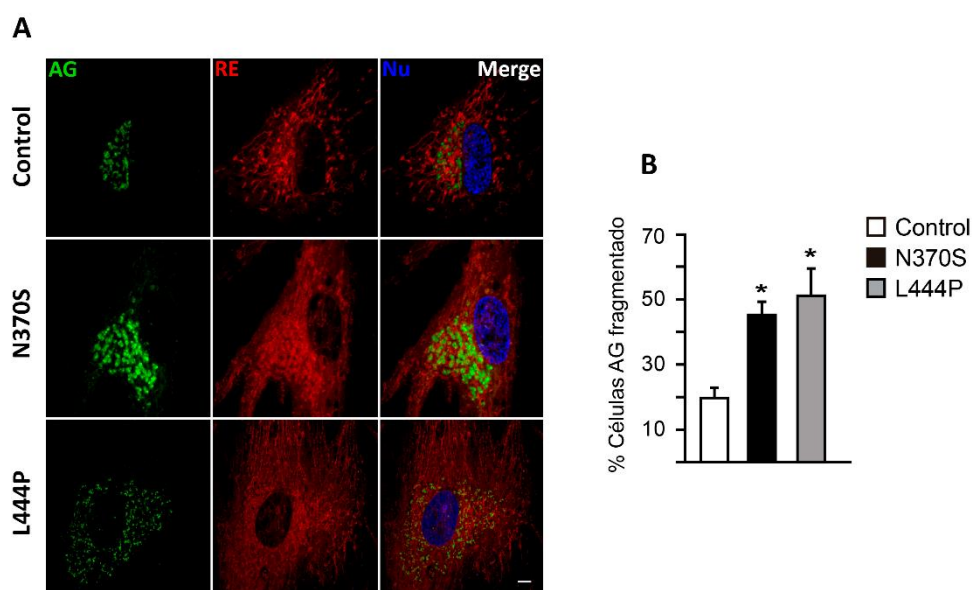


Figura 15. Las mutaciones en *GBA1* provocan una fragmentación del aparato de Golgi. (A) Imágenes de confocal de fibroblastos control y parkinsonianos teñidos con el kit CytoPainter donde se visualiza el AG en verde, el RE en rojo y el núcleo en azul. Se observa la fragmentación del AG con las cisternas en forma vesicular repartidas por el citoplasma en las células mutantes, en contraste con la forma de semiluna que aparece en las células control. (B) Cuantificación del porcentaje de células con el AG fragmentado. Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. *P < 0.05 vs controles. Análisis de χ^2 . Barra de escala: 10 μ m

A continuación, se monitorizó la formación de autofagosomas, a través del análisis de la proteína de membrana de los autofagosomas (LC3B) y la degradación del contenido autofágico a través de la proteína p62/SQSTM1. En primer lugar, se utilizaron fibroblastos que sobre-expresan LC3B-GFP, donde cuantificamos la señal de GFP mediante la intensidad integrada de la fluorescencia. El tratamiento con EBSS aumenta la cantidad de autofagosomas, tanto en los fibroblastos control como en los mutantes, al igual que ocurre con el tratamiento de rapamicina (inductor de la autofagia al inhibir a p-mTOR) (Fig. 17A y B). Cabe destacar, que este incremento es significativamente

mayor en los fibroblastos N370S que en los controles, aunque sólo tras el tratamiento con rapamicina. Por el contrario, este incremento es significativamente menor en los fibroblastos L444P. Por otro lado, tras el tratamiento con Bafilomicina-A1 (Baf-A1), que bloquea la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, se produce un incremento significativo de LC3B-GFP en todos los tipos de fibroblastos, lo que implica una acumulación de autofagosomas. De forma similar a lo que ocurre con la inducción de la autofagia, este aumento es significativamente mayor en los fibroblastos N370S y menor en los L444P (Fig. 17A y B).

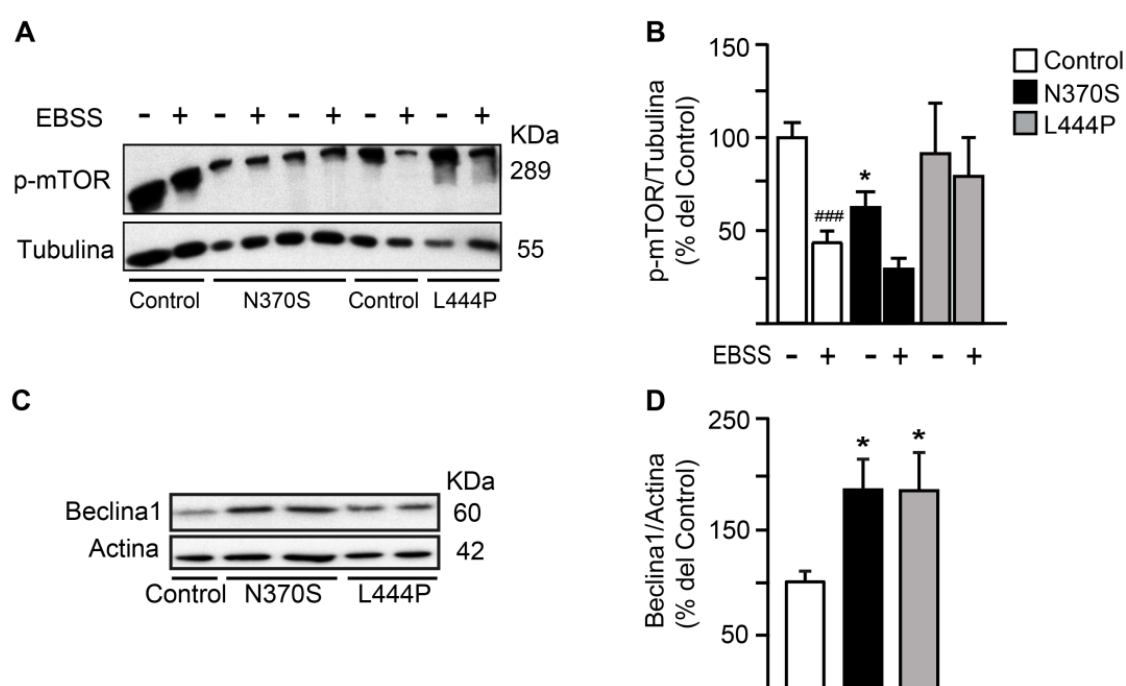


Figura 16. Las mutaciones en *GBA1* alteran los reguladores de la vía autofágica. (A, B) WB representativo de p-mTOR y cuantificación de la densitometría tras el tratamiento con EBSS durante 4 h. (C, D) WB representativo de Beclina1 y cuantificación de la densitometría. Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. *P < 0.05 vs controles; ###P < 0.001 vs basal. Análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-hoc Bonferroni (B) y ANOVA de una vía seguido del post-hoc Bonferroni (D).

Estos resultados se confirmaron por WB, donde a nivel basal, se observa un incremento significativo de los niveles de la proteína LC3II en los fibroblastos N370S y un descenso significativo en los fibroblastos L444P (Fig. 18A y B). La Baf-A1 aumenta significativamente la cantidad de LC3II en todos los tipos de fibroblastos. En el caso de

las células L444P, se trata de un pequeño aumento, aunque significativo. Al igual de lo que ocurría en los experimentos de LC3B-GFP, el aumento de LC3II es mayor en las células N370S que en las L444P o en los controles (ver Fig. 17A y B). Estos resultados sugieren que los fibroblastos N370S tienen la autofagia exacerbada, lo que se traduce en más cantidad de autofagosomas; mientras que los L444P a pesar de tener activada la autofagia por la vía de Beclina1, tienen menos autofagosomas. Esto podría deberse a defectos en la formación y/o maduración de los autofagosomas.

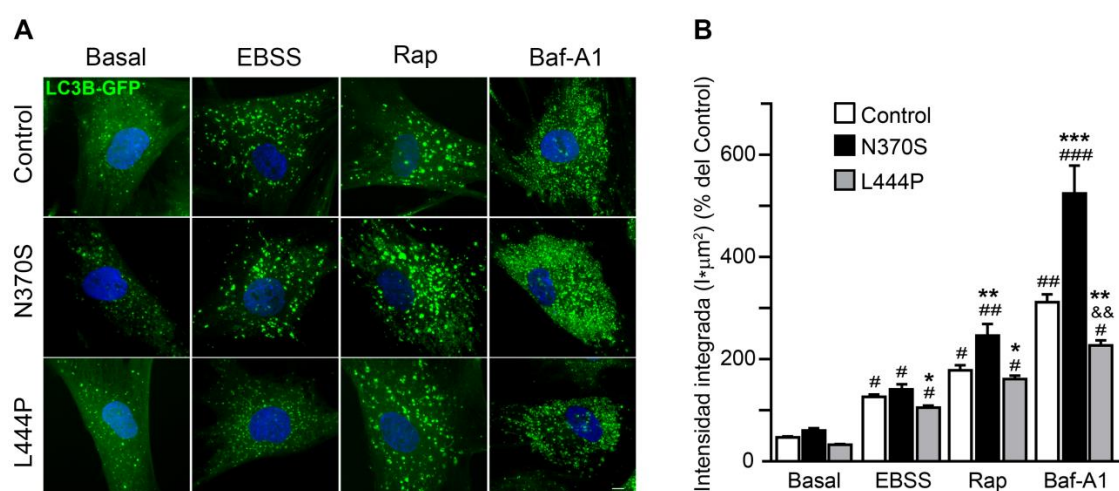


Figura 17. Los tratamientos que inducen o inhiben la autofagia no afectan por igual a la producción de autofagosomas en los fibroblastos mutantes. (A) Imágenes representativas de fibroblastos LC3B-GFP tras EBSS, rapamicina (Rap, 500 nM) o bafilomicina-A1 (Baf-A1, 100 nM) durante 4 h. (B) Análisis de la intensidad integrada de la señal de fluorescencia de LC3B-GFP. Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs controles; &P < 0.01 vs. N370S; #P < 0.05; ##P < 0.01; ###P < 0.001 vs basales. Análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-hoc Bonferroni (B). Barra de escala: 10 μ m.

Para corroborar los resultados obtenidos con LC3B-GFP y LC3II, estudiamos la proteína p62/SQSTM1 por WB y por inmunocitoquímica. Puesto que p62/SQSTM1, además de marcar las proteínas que se van a degradar, interacciona con LC3II en la formación de los autofagosomas. Los experimentos de WB indican que, en condiciones basales, los fibroblastos mutantes presentan un aumento significativo de los niveles de p62/SQSTM1 en comparación con los controles (Fig. 18C y D). Sin embargo, no se producen cambios cuando se induce la autofagia con EBSS ni se potencia esa

acumulación cuando se combinan los tratamientos de EBSS y Baf-A1. Esta combinación sólo produce un incremento significativo en el caso de las células control (Fig. 18C y D). En línea con estos resultados, la inhibición de la degradación lisosomal con los compuestos leupeptina y cloruro de amonio (NH_4Cl) junto con EBSS produce un aumento de p62/SQSTM1 en los fibroblastos control, detectado mediante inmunocitoquímica en células LC3B-GFP positivas (Fig. 18E), además de aumentar la colocalización de p62/SQSTM1 y LC3B-GFP. Sin embargo, los fibroblastos mutantes muestran ya un aumento de p62/SQSTM1 en condiciones basales, similar a los controles tras la inhibición lisosomal (Fig. 18E) y el tratamiento no potencia este aumento.

6. Alteraciones lisosomales en fibroblastos con mutaciones en *GBA1*

Para determinar si la acumulación de p62/SQSTM1 se debe a un defecto en la degradación lisosomal, analizamos la etapa final de la autofagia, en concreto, la función lisosomal. En primer lugar, se midió la cantidad de orgánulos ácidos utilizando la sonda LysoTracker®. Los resultados obtenidos revelan un aumento significativo de la masa lisosomal medida como la intensidad integrada de la señal de LysoTracker® en los fibroblastos mutantes en comparación con los controles (Fig. 19A y B). Por otro lado, los tratamientos con EBSS o rapamicina potencian significativamente el aumento de la señal de LysoTracker® en los fibroblastos mutantes con respecto a los controles. En segundo lugar, se determinaron los niveles de la proteína LAMP1 (se encuentra en la membrana del lisosoma) por WB. En condiciones basales, los fibroblastos N370S o L444P tienen aumentados significativamente los niveles LAMP1 con respecto a los controles (Fig. 19 C y D) confirmando los resultados obtenidos con la tinción de LysoTracker®. Por otro lado, el tratamiento con Baf-A1 aumenta significativamente los niveles de LAMP1, exclusivamente en los controles, no potenciando este incremento en las células mutantes más allá de lo observado en las controles.

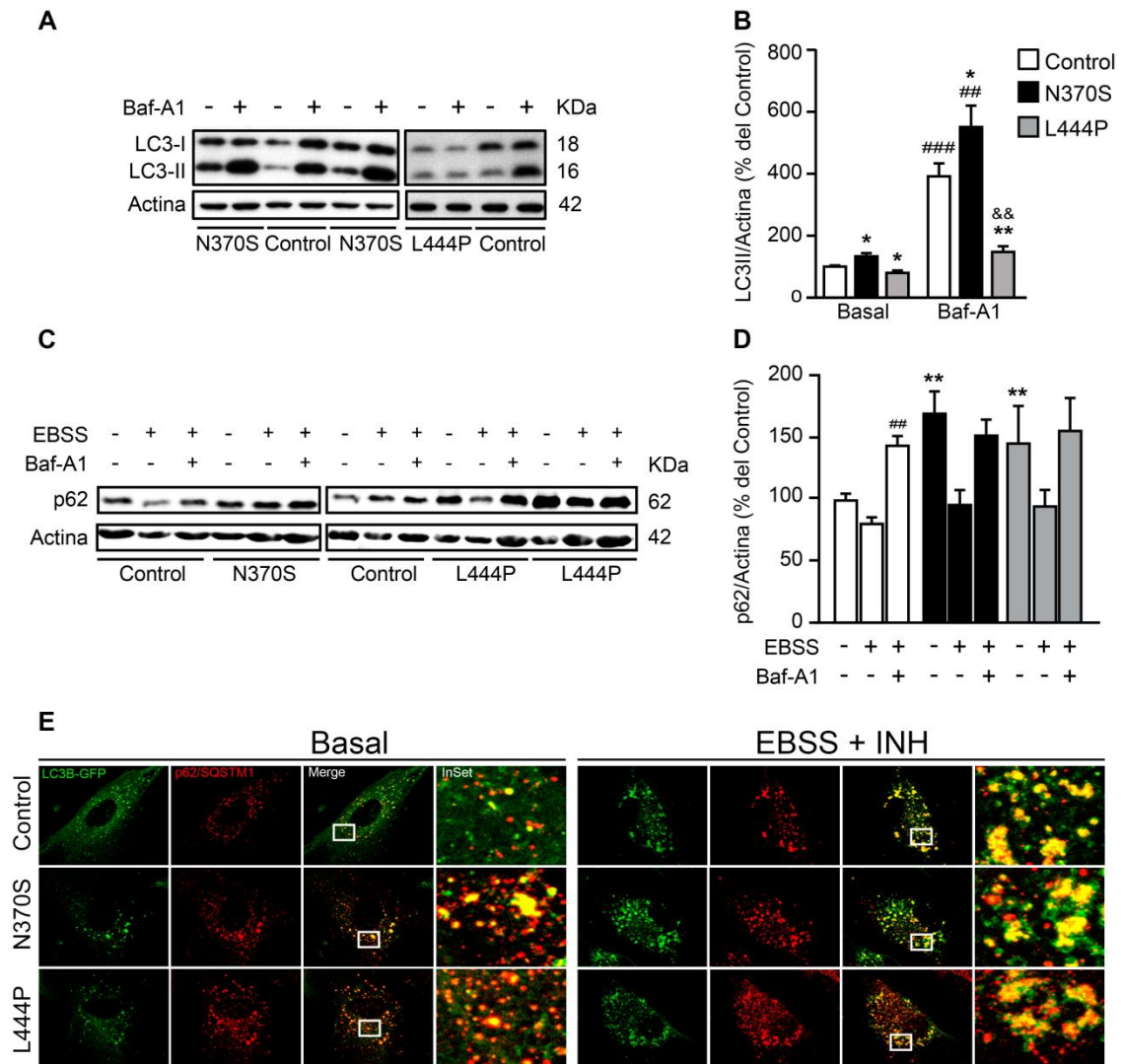


Figura 18. Las mutaciones en *GBA1* alteran los marcadores de autofagosomas. (A, B) WB representativos de LC3-II y cuantificación de la densitometría tras el tratamiento con bafilomicina-A1 (Baf-A1, 100nM) durante 4 h. (C, D) WB representativo de p62/SQSTM1 y cuantificación de la densitometría tras los tratamientos de EBSS y EBSS junto con Baf-A1 durante 4 h. (E) Inmunofluorescencia de p62/SQSTM1 (rojo) en fibroblastos LC3B-GFP (verde) en condiciones basales y tras el tratamiento con EBSS junto con los inhibidores leupeptina (100 μ M) y NH_4Cl (20 mM) durante 4 h. Los detalles ampliados (insets) se muestran adyacentes a las imágenes correspondientes. Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs controles; && $P < 0.01$ vs. N370S; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$ vs basales. Análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-hoc Bonferroni. Barra de escala: 10 μ m.

A continuación, se analizó la actividad de varias enzimas lisosomales (hidrolasas y proteasas) así como sus niveles proteicos. En concreto, se midió la actividad de las hidrolasas β -Gal y β -HexA. Los fibroblastos mutantes presentan una menor actividad β -Gal (Fig. 20A), aunque no presentan cambios en la actividad de β -HexA (Fig. 20B). Por citometría de flujo se determinó la actividad de la enzima catepsina B (CatB), y como se

puede observar en la Fig. 20C y D, su actividad está también disminuida significativamente en los fibroblastos mutantes. Curiosamente, al analizar los niveles de proteicos de las catepsinas, observamos que los fibroblastos N370S tienen mayores niveles de CatB y catepsina D (CatD), mientras que las células con la mutación L444P sólo presentan un incremento significativo en la cantidad CatD (Fig. 20E-G).

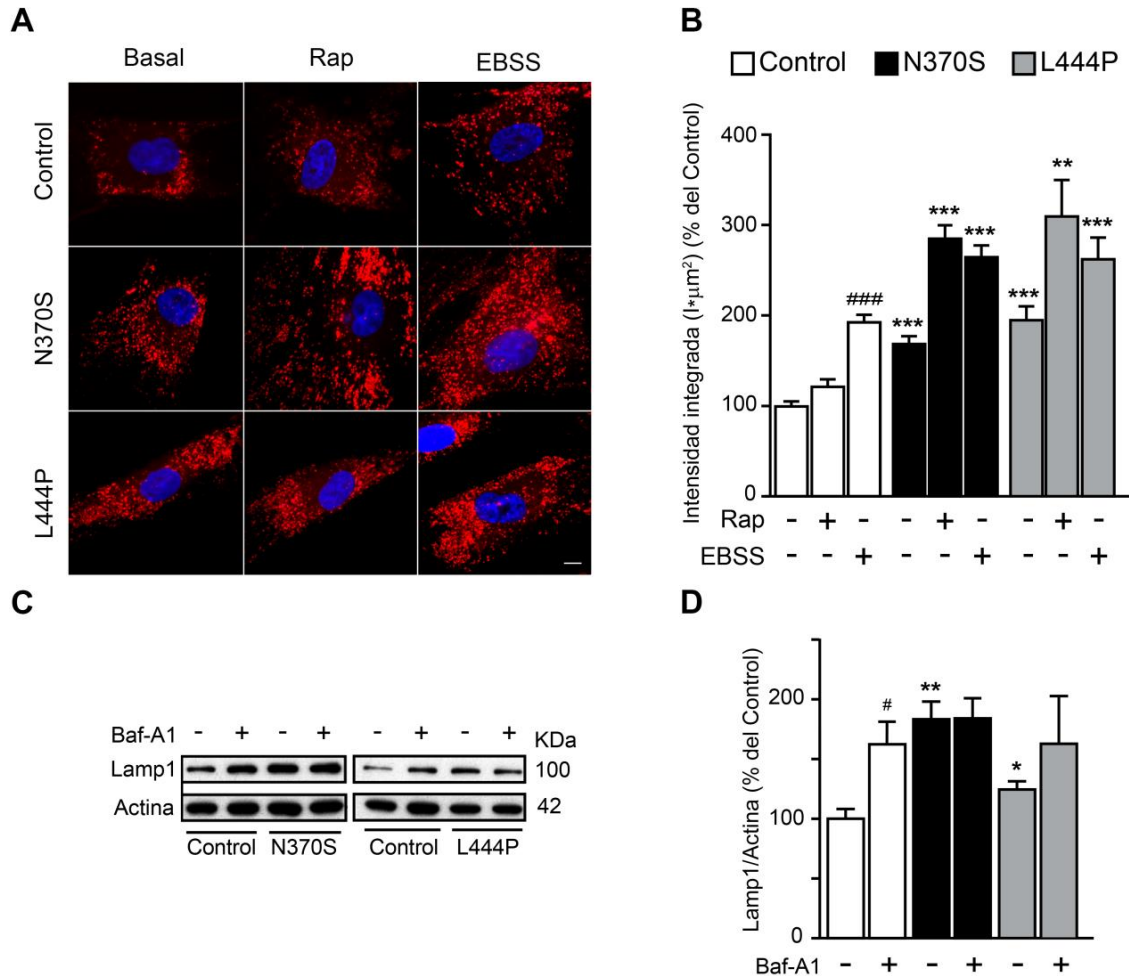


Figura 19. Las mutaciones en *GBA1* incrementan la cantidad de los lisosomas. (A) Imágenes representativas de fibroblastos teñidos con la sonda LysoTracker® tras el tratamiento con EBSS, rapamicina (Rap, 500 nM) durante 4 h. (B) Cuantificación de la intensidad integrada de LysoTracker® observese mayor fluorescencia en las células mutantes. (C, D) WB representativo de LAMP1 y su cuantificación tras Baf-A1 (100 nM) durante 4 h. Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs controles; # P < 0.05, ### P < 0.001 vs basales. Análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-hoc Bonferroni. Barra de escala: 10 µm.

Estos resultados no van en consonancia con los obtenidos de sus actividades enzimáticas, lo que sugiere que los fibroblastos mutantes, a pesar de tener más cantidad de hidrolasas, de acuerdo al aumento en la cantidad de lisosomas, éstas no son igual de funcionales que las de las células control.

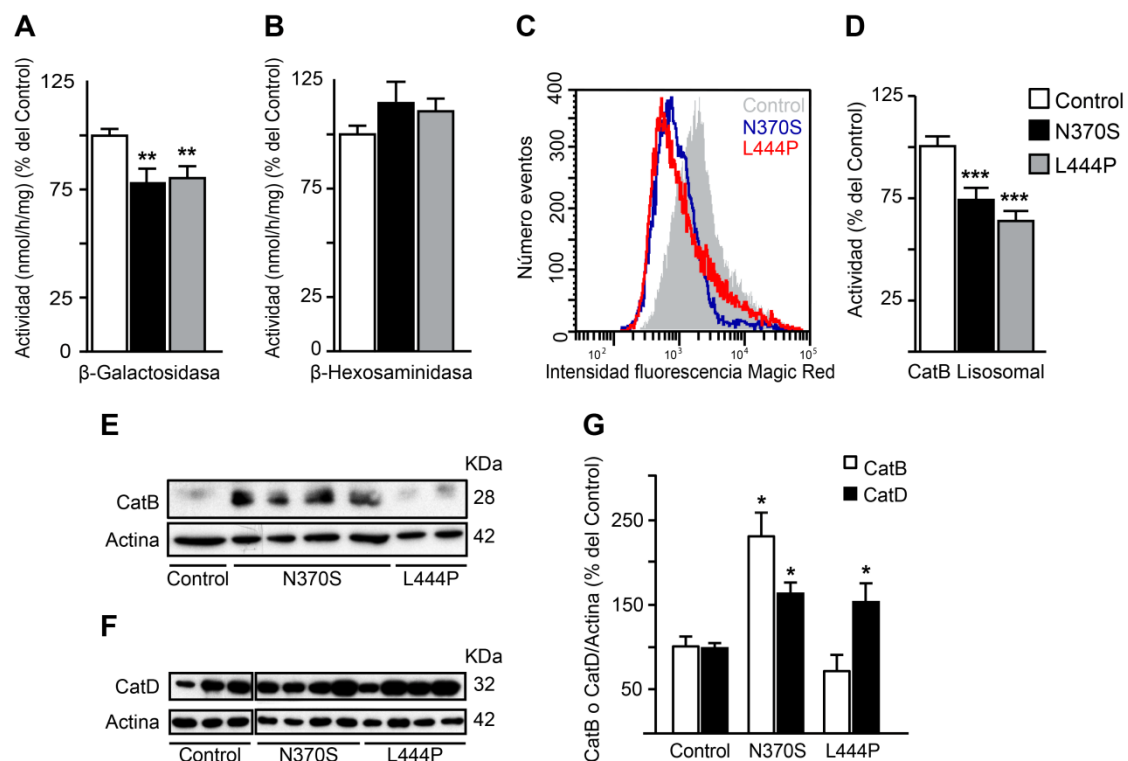


Figura 20. Las mutaciones en GBA1 alteran la función lisosomal. Los paneles muestran la actividad β -galactosidasa (A) y β -hexosaminidasa (B) medida por fluorimetría y de la catepsina D (C, D) determinada por citometría de flujo. Se observa una disminución en la actividad de la β -galactosidasa y de la catepsina D. (E-G) WB representativos de las catepsinas B y D y cuantificación de la densitometría. Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs controles. Análisis de ANOVA de una vía seguido del post-hoc Bonferroni (A, B, G) y Kruskal–Wallis seguido del post-hoc de Dunn (D).

7. El colesterol se acumula en los lisosomas de los fibroblastos con mutaciones en GBA1

Recientemente se ha descubierto que la GCasa1 también tiene actividad glucosiltransferasa, la cual cataliza la formación de β -colesteril-glucósido (β -GlcCol) a partir de GlcCer y colesterol (Franco *et al.*, 2018). Además, está demostrado que la acumulación de colesterol intracelular afecta la estabilidad de la GCasa1 en la

enfermedad de NPC (Salvioli *et al.*, 2004) y la degradación ERAD en la progresión de la EG (Ron y Horowitz, 2008). Para explorar si la disminución de la actividad de la GCasa1 tiene un efecto sobre el metabolismo de los lípidos, se midieron los niveles de colesterol libre en las células utilizando la tinción de Filipin III. En las imágenes de fluorescencia se observa que los fibroblastos mutantes presentan mayor señal de Filipin III que en las células control, donde la señal es más débil y dispersa (Fig. 21A). Cabe destacar, que en los fibroblastos mutantes, la señal de Filipin III se acumula en estructuras con forma vacuolar, lo que sugiere una posible asociación con algún orgánulo celular específico. Para saber si estas estructuras se correspondían con lisosomas, se analizó el patrón de marcaje del Filipin III con el del LysoTracker®. Las imágenes y el análisis de colocalización, mediante el PCC, muestran que existe una co-distribución significativamente mayor en los lisosomas de fibroblastos mutantes que en los controles (Fig. 21A y B). Lo que es más, usando un método más preciso para cuantificar el colesterol libre dentro de los lisosomas encontramos que la intensidad integrada de Filipin III en los orgánulos LysoTracker® positivos es significativamente más elevada en los fibroblastos mutantes (Fig. 21C).

8. La cloroquina causa la acumulación de colesterol y cuerpos lamelares en los fibroblastos control pero no en los procedentes de pacientes parkinsonianos

Para comprender los mecanismos que conducen al aumento del colesterol en los lisosomas, utilizamos el compuesto cloroquina (CQ). Este compuesto inhibe el tráfico del colesterol hacia el RE, produciéndose así su acumulación en los lisosomas (King MA *et al.*, 2016).

En los fibroblastos control, la CQ induce la formación de vesículas de localización perinuclear positivas para Filipin III y por tanto, acumulan colesterol. (Fig. 22A y B). Este patrón de la señal del Filipin III es similar al que se observa en los fibroblastos mutantes en condiciones basales. Sin embargo, la CQ no potencia la tinción de Filipin III en los fibroblastos mutantes más allá de lo que se observa en condiciones basales (Fig. 22A y B). Por otro lado, en los estudios de MET, la CQ produce la aparición de cuerpos multilamelares (CML) en las células control. Estos CML son característicos de ciertas

enfermedades de desórdenes lisosomales (Parkinson-Lawrence *et al.*, 2010) y en la literatura están descritos como estructuras vacuolares con multitud de espirales en su interior que podrían ser lipídicas (Fig. 22C y D). Como ocurría con la tinción de Filipin, estos CML también se acumulan en los fibroblastos parkinsonianos en condiciones basales, siguiendo un patrón similar al que se observa en los controles tras el tratamiento de CQ (Fig. 22D). Todos estos resultados indican que la acumulación de CML en los fibroblastos mutantes podría corresponder con lisosomas degenerados, que en condiciones basales ya acumulan colesterol libre, entre otros lípidos. Esta podría ser la razón por la que los fibroblastos mutantes no incrementan sus niveles de colesterol libre ni la cantidad de CML tras la inducción de fosfolipidosis con el tratamiento de CQ.

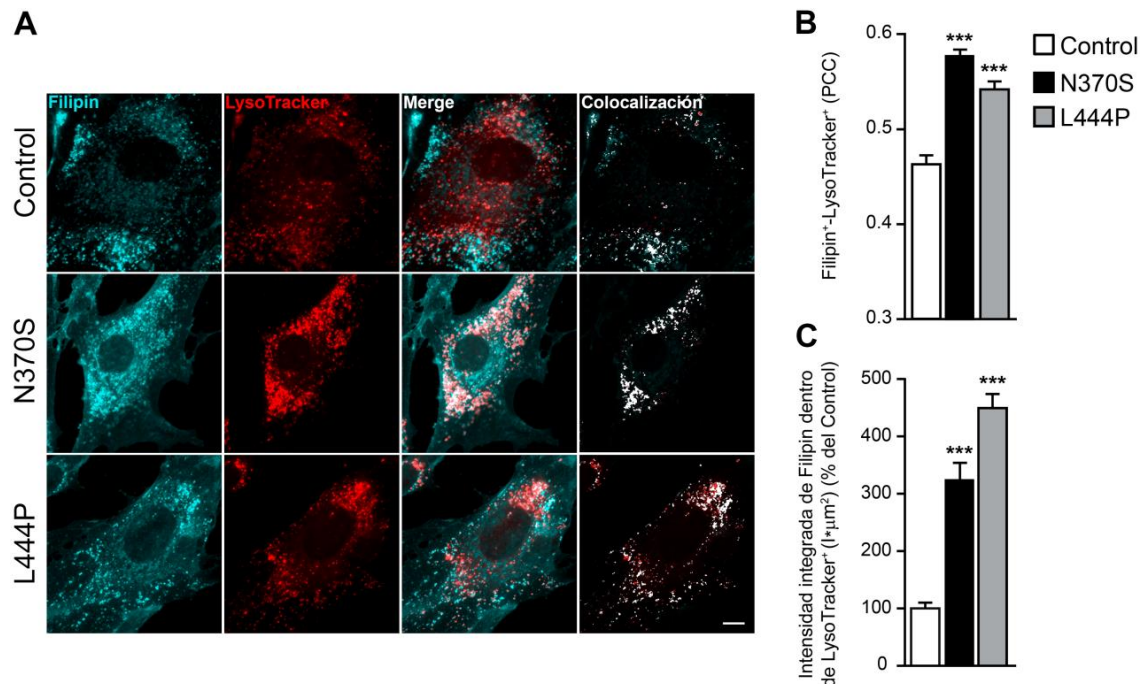


Figura 21. Las mutaciones en *GBA1* producen acumulación de colesterol en los lisosomas. (A) Imágenes representativas de las tinciones de LysoTracker® y Filipin mostrando mayor colocalización de lisosomas y colesterol libre en los fibroblastos mutantes. A la derecha se muestran las imágenes con la máscara de colocalización. (B) Cuantificación de la colocalización entre LysoTracker® y Filipin usando el coeficiente de correlación de Pearson (PCC). (C) Cuantificación de la intensidad integrada de la señal de Filipin dentro de los orgánulos positivos para LysoTracker®. Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. *** $P < 0.001$ vs controles. Análisis de Kruskal-Wallis seguido del post-hoc de Dunn. Barra de escala: 10 μ m.

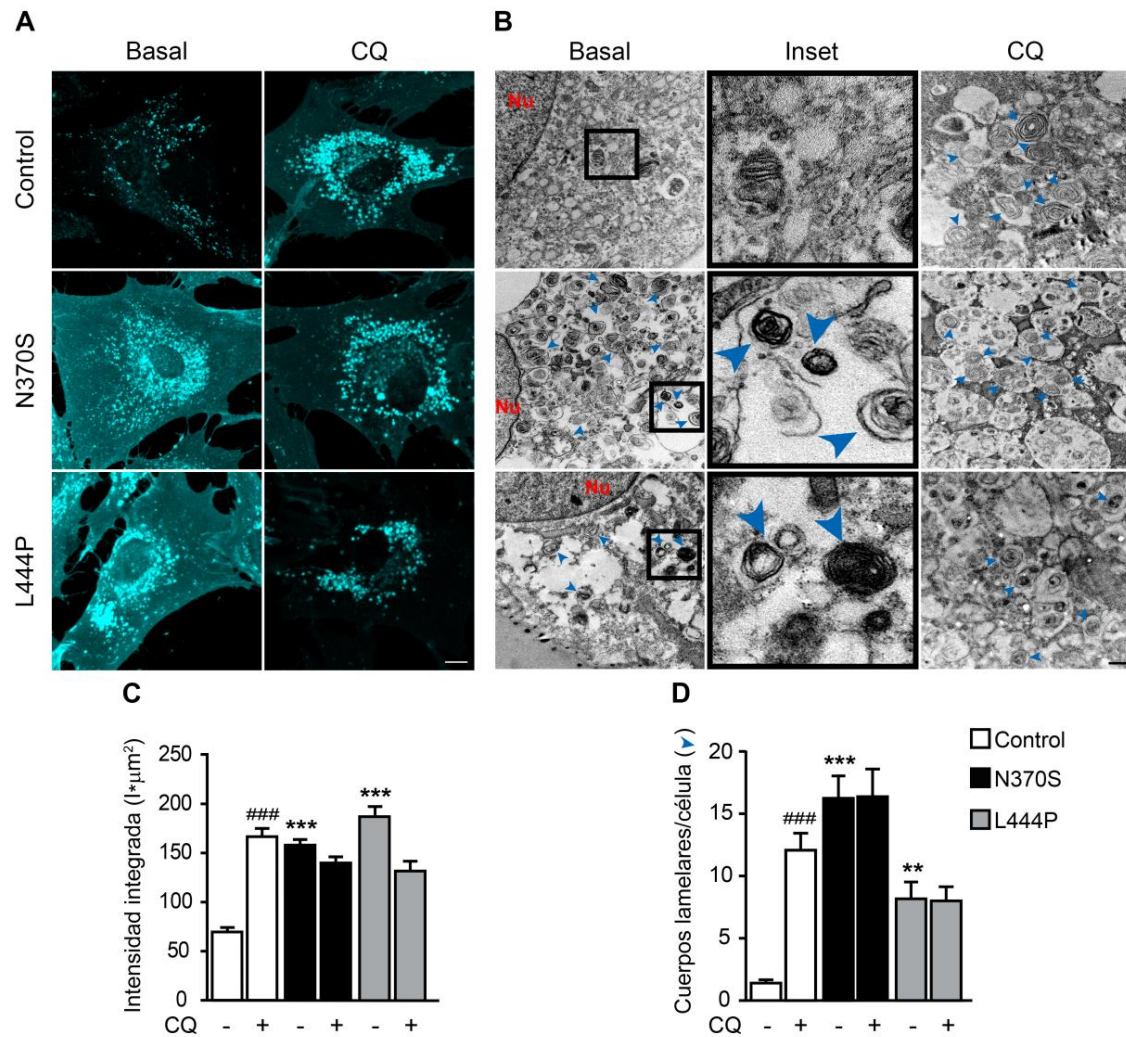


Figura 22. Los fibroblastos mutantes acumulan colesterol y cuerpos multilamelares en condiciones basales. (A, C) Imágenes representativas y su cuantificación mostrando que la cloroquina (CQ, 50 μM durante 4 h) incrementa la señal de Filipin en los fibroblastos control pero no en los mutantes. (B) Imágenes de MET en las que se aprecia la acumulación de cuerpos lamelares en los fibroblastos mutantes. En los detalles ampliados puede verse la ondulación típica de las membranas concéntricas de los cuerpos lamelares, lo que sugiere un aumento del almacenamiento de colesterol libre en las células mutantes. (D) Cuantificación de los cuerpos lamelares por célula. Nótese que estas estructuras aparecen en condiciones basales en los fibroblastos con las mutaciones y que la CQ sólo las aumenta en las células control. Cuerpos lamelares, cabezas de flecha azules; Nu, núcleo. Los datos representan la media ± s.e.m de al menos tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. **P < 0.01; ***P < 0.001 vs controles. ### P < 0.001 vs basales. Análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-hoc Bonferroni. Barra de escala: 10 μm (A) y 0.5 μm (B).

9. Los fibroblastos con mutaciones en *GBA1* presentan alteraciones en el estado redox intracelular

Estudios en modelos de la EG demuestran que la retención de la GCasa1 activa la respuesta UPR y esto a su vez, resulta en una situación de estrés oxidativo en el citosol

(Ron y Horowitz, 2005; Schmitz *et al.*, 2005). Por tanto, para determinar si las mutaciones N370S y L444P afectan el estado redox celular, al tener los fibroblastos mutantes una retención parcial de la GCasa1 en el RE, se evaluó la producción de ROS. Para ello se realizaron ensayos de citometría de flujo con las sondas CM-H₂DCFDA y DHE que detectan niveles de peróxidos y anión superóxido, respectivamente. En condiciones basales, los niveles de peróxidos sólo se incrementan significativamente en los fibroblastos L444P (Fig. 23A y B). Sin embargo, ambas mutaciones aumentan significativamente los niveles de anión superóxido (Fig. 23C y D). Tras la estimulación con tBHP, sólo en el caso de la mutación N370S se produce un incremento de los peróxidos significativamente mayor al que se produce en las células control (Fig. 23A y B). En cambio, en el caso del anión superóxido, el tratamiento con tBHP sólo tuvo efecto en las células control y no potenció su aumento en los fibroblastos mutantes más allá de los encontrados en condiciones basales (Fig. 23C y D). Todos estos resultados indican que las mutaciones N370S y L444P producen un incremento del estrés oxidativo.

Para determinar si el aumento de ROS se debe a la falta de enzimas antioxidantes, se estudió si estas mutaciones producen alteraciones en la expresión de algunas de las principales enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD1) y la catalasa (CAT). Para ello, mediante ensayos de qRT-PCR analizamos los niveles de ARNm y mediante WB determinamos la cantidad de proteína. En condiciones basales, vimos que los fibroblastos con la mutación N370S tenían aumentados significativamente los niveles de ARNm tanto de la enzima SOD1 como de la CAT (Fig. 24A). Sin embargo, en el caso de la mutación L444P, sólo se encontró un incremento significativo de SOD1. Estos resultados se confirmaron mediante WB donde en condiciones basales, los niveles de SOD1 también están significativamente incrementados en los fibroblastos mutantes (Fig. 24B-C). El tratamiento con tBHP sólo incrementa SOD1 en los fibroblastos control y no en los mutantes. La falta de respuesta al tBHP en los mutantes podría deberse a que en estado basal, la SOD1 presenta niveles máximos, por lo que su inducción es mínima o nula en situación de estrés oxidativo. Esto quiere decir que el sistema antioxidante se encuentra hiper-activado en las células mutantes y a pesar de esto, no es capaz de eliminar el exceso de producción de ROS (Fig. 24B y C).

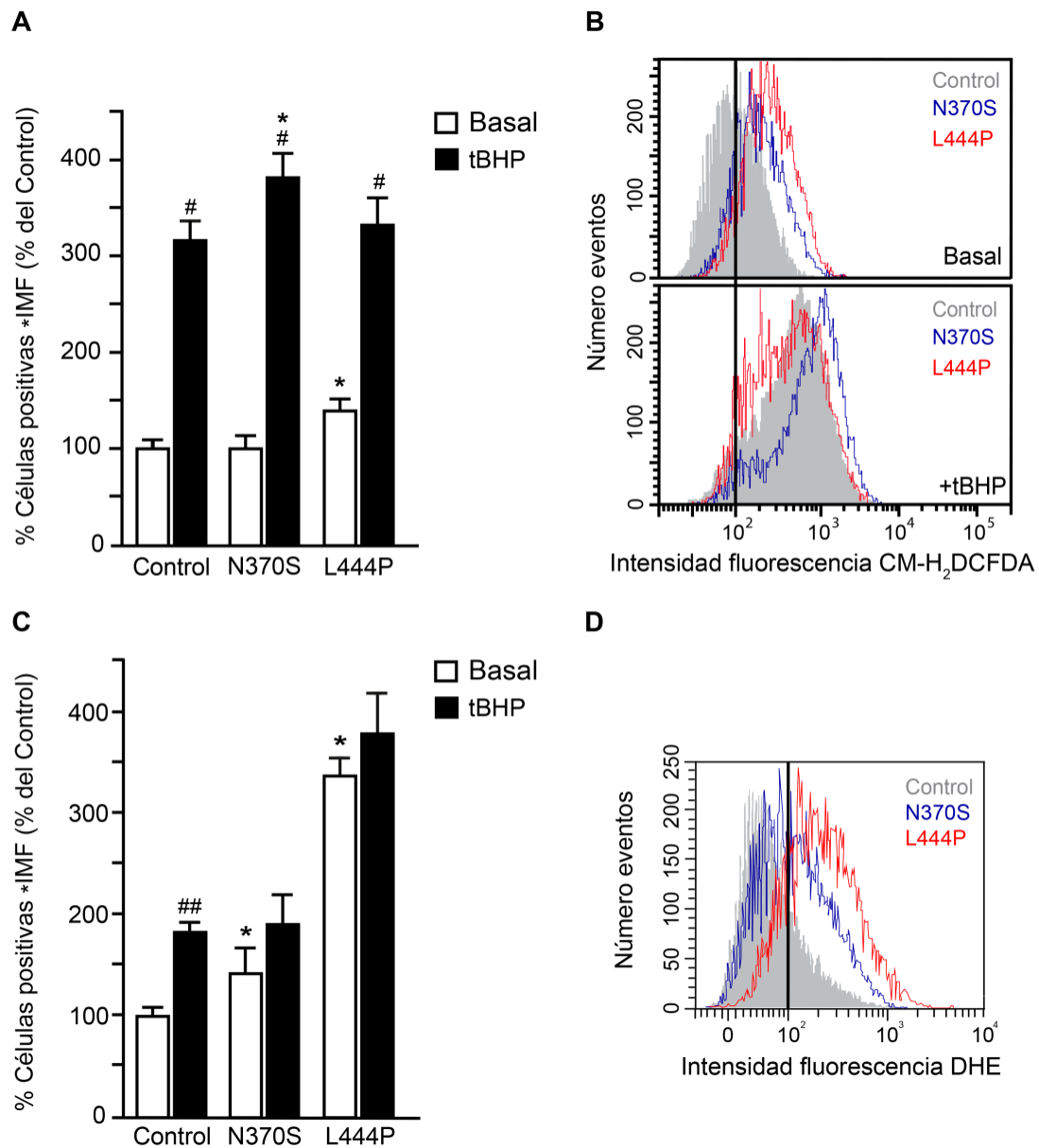


Figura 23. Las mutaciones en *GBA1* incrementan los niveles de especies reactivas de oxígeno. (A, B) Cuantificación y gráficos representativos de la intensidad de CM-H₂DCFDA ilustrando los niveles celulares de peróxidos tras el tratamiento con tBHP (100 μ M durante 4 h). (C, D) Cuantificación y gráficos representativos de la intensidad de DHE ilustrando el anión superóxido en fibroblastos mutantes después del tratamiento con tBHP. Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. *P < 0.05 vs controles; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs basales. Análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-hoc Bonferroni.

10. Las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA1* en heterocigosis alteran la morfología de la red mitocondrial

Los resultados obtenidos sobre la producción de ROS pueden ser indicadores del mal funcionamiento de las mitocondrias, por lo que estudiamos su ultraestructura mediante MET. Como se observa en la Fig. 25A, las mitocondrias de ambos tipos de

fibroblastos mutantes muestran alteraciones en su ultraestructura. En concreto se observa que las mitocondrias de estos fibroblastos presentan una especie de engrosamiento (del inglés, *swelling*) (Fig. 25A, asteriscos), evidente en la mayoría de los fibroblastos mutantes. Existen estudios que demuestran que la proteína PINK1 es fundamental para el mantenimiento de la morfología mitocondrial de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra en cultivo. Mutaciones en el gen que codifica esta proteína dan lugar a alteraciones en la morfología mitocondrial, además de una actividad reductora anormal del complejo I de la cadena respiratoria. Esto desencadena una situación de estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas (Gautier *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). Dado que los fibroblastos con la mutación L444P presentan mayor estrés oxidativo y alteraciones en la ultraestructura de las mitocondrias, se llevó a cabo un estudio en mayor profundidad, para investigar la integridad de la red mitocondrial en estos fibroblastos mutantes en comparación con los controles. Para ello, se infectaron los diferentes tipos de fibroblastos utilizando partículas lentivirales que contenían el plásmido mtDsRed, que expresa la proteína DsRed bajo el promotor de la subunidad IV de la proteína mitocondrial COX IV. De esta manera, se pudo detectar la red mitocondrial de los fibroblastos al microscopio de fluorescencia.

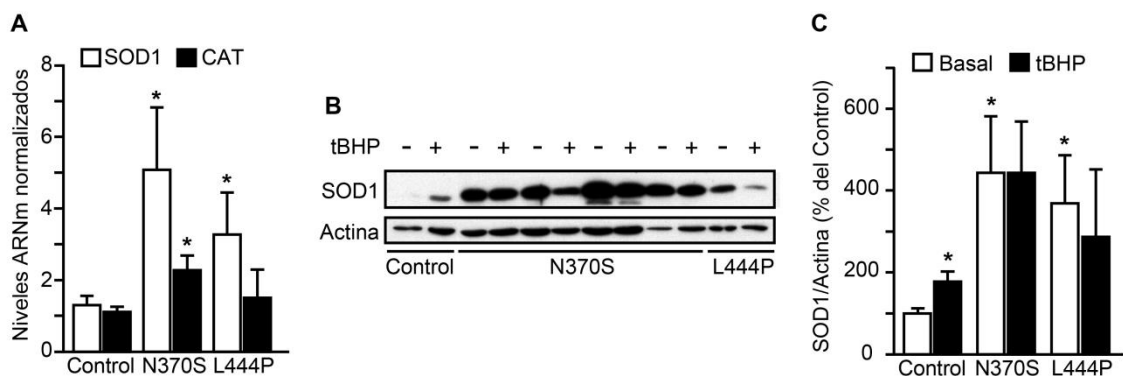


Figura 24. Las mutaciones en *GBA1* afectan al sistema antioxidante. (A) Análisis de la expresión de los genes *SOD1* y *CAT* como marcadores de estrés oxidativo. (B, C) WB representativos y su cuantificación de la proteína *SOD1* tras el tratamiento con tBHP (100 μ M durante 4 h). Nótese que el tBHP incrementa los niveles de *SOD1* en los controles y no en los fibroblastos con las mutaciones. Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. * $P < 0.05$ vs controles. Análisis de ANOVA de una vía seguido del post-hoc Bonferroni (A) y Kruskal–Wallis seguido del post-hoc de Dunn (C).

El análisis de las imágenes tomadas en el microscopio confocal (Fig. 25B) muestra que los fibroblastos con la mutación L444P tienen un aumento significativo del número de fragmentos sin ramificaciones (llamadas en inglés, *individuals*) (Fig. 25C) así como del número de redes (Fig. 25D). En cambio, estas redes presentan significativamente menos ramificaciones (Fig. 25E) y son más pequeñas (Fig. 25F) que las de los fibroblastos controles. En cambio, no se observan diferencias en la superficie celular que ocupan las mitocondrias (Fig. 25G). Todos estos resultados juntos demuestran que la morfología y complejidad de la red mitocondrial se encuentran alteradas en los fibroblastos con la mutación L444P.

11. Los fibroblastos con mutaciones en *GBA1* son más vulnerables a estímulos citotóxicos

Actualmente se sabe que alteraciones del sistema autofagia-lisosoma (Boya *et al.*, 2013) así como un excesivo estrés del RE, cuando la activación de la vía UPR no es suficiente para reestablecer la homeostasis celular, (Senft y Ronai, 2015) pueden conducir a procesos de apoptosis y muerte celular. Debido a que las mutaciones en *GBA1* causan este tipo de alteraciones de la homeostasis celular, quisimos determinar si esto podría afectar la vulnerabilidad celular de los fibroblastos mutantes procedentes de pacientes parkinsonianos.

Para evaluar si las mutaciones N370S o L444P tienen algún efecto en la vulnerabilidad celular, se realizaron ensayos de citometría de flujo con las sondas Anexina V-FICT/IP en todos en fibroblastos en presencia o ausencia de CQ (estresor citotóxico). La combinación de estas dos sondas nos permitió distinguir entre células en apoptosis temprana (anexina V-FICT positivo/IP negativo), en apoptosis tardía (anexina V-FICT positivo/IP positivo) y en necrosis (anexina V-FICT negativo/IP positivo; (Fig. 26A y B). En condiciones basales no se observan cambios entre los fibroblastos control y los mutantes. El tratamiento con CQ incrementa significativamente el porcentaje de células N370S en apoptosis con respecto al incremento observado en los controles. En cambio, en las células L444P, aunque también se observa un aumento de células apoptóticas, éste no es significativo (Fig. 26A). Por otro lado, la CQ incrementa el porcentaje de

células que están en necrosis en todas las líneas de fibroblastos, aunque no es significativo en ninguno de los grupos celulares (Fig. 26B). Estos resultados indican que los fibroblastos con las mutaciones en el gen *GBA1* son más vulnerables a la apoptosis tras un estímulo citotóxico como el de la CQ.

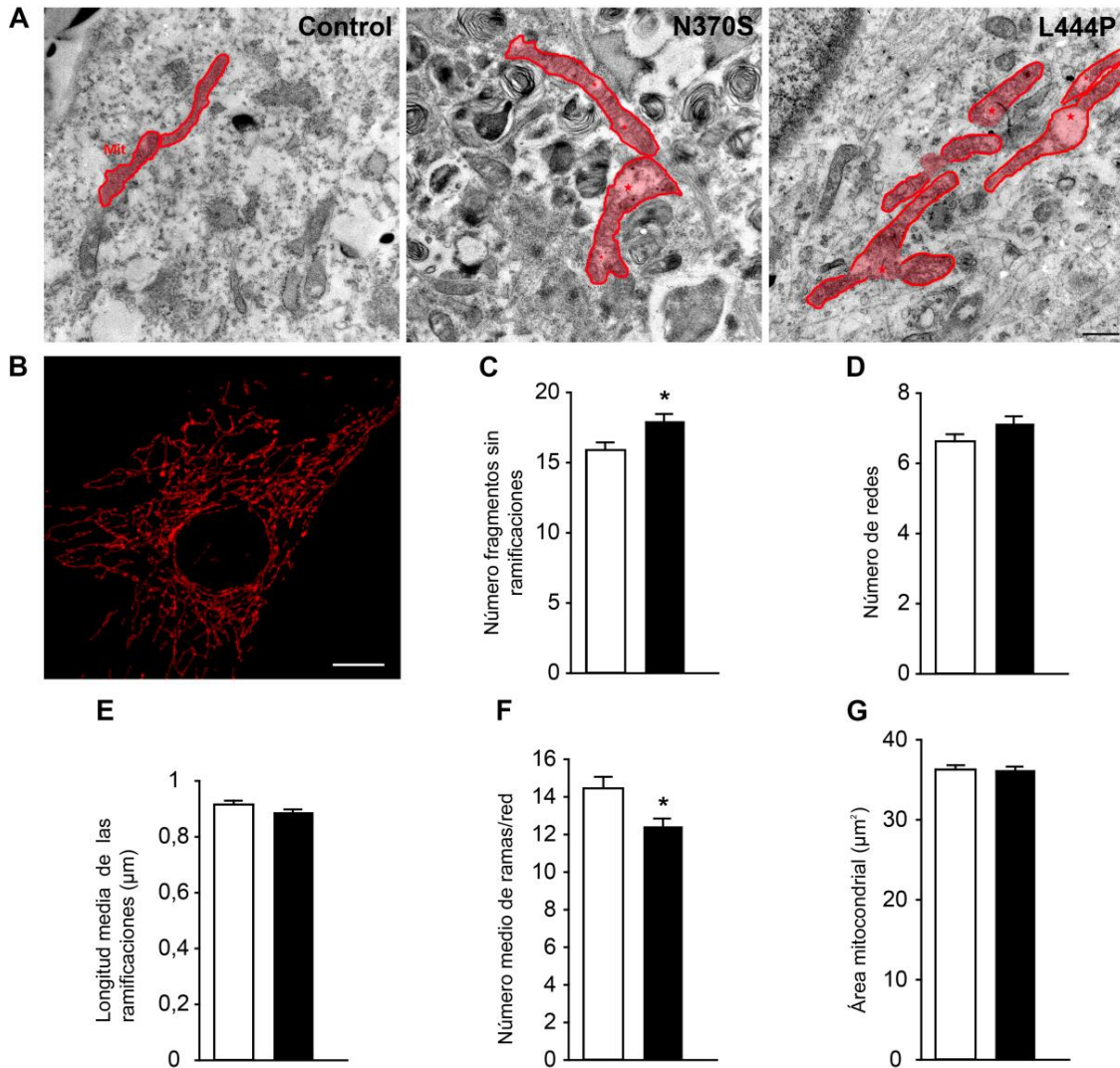


Figura 25. La mutación L444P en *GBA1* altera la complejidad de la red mitocondrial. (A) Imágenes de representativas obtenidas por MET que muestran la ultraestructura de las mitocondrias (pseudo-coloreadas en rojo). Éstas se observan fragmentadas y dilatadas (*) en los fibroblastos mutantes. (B) Imagen representativa tras la transducción con el lentivirus pWPXL-mtDsRed donde se visualiza la red mitocondrial en rojo. (C-G) Análisis de los diferentes parámetros relativos a la complejidad de la red mitocondrial: (C) Objetos individuales, números de redes (D), longitud de las ramas (E), número de ramas (F) y área mitocondrial (G). Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. * $P < 0.05$ vs controles. Análisis de t-Student. Barra de escala: 0.5 μm (A) y 10 μm (B).

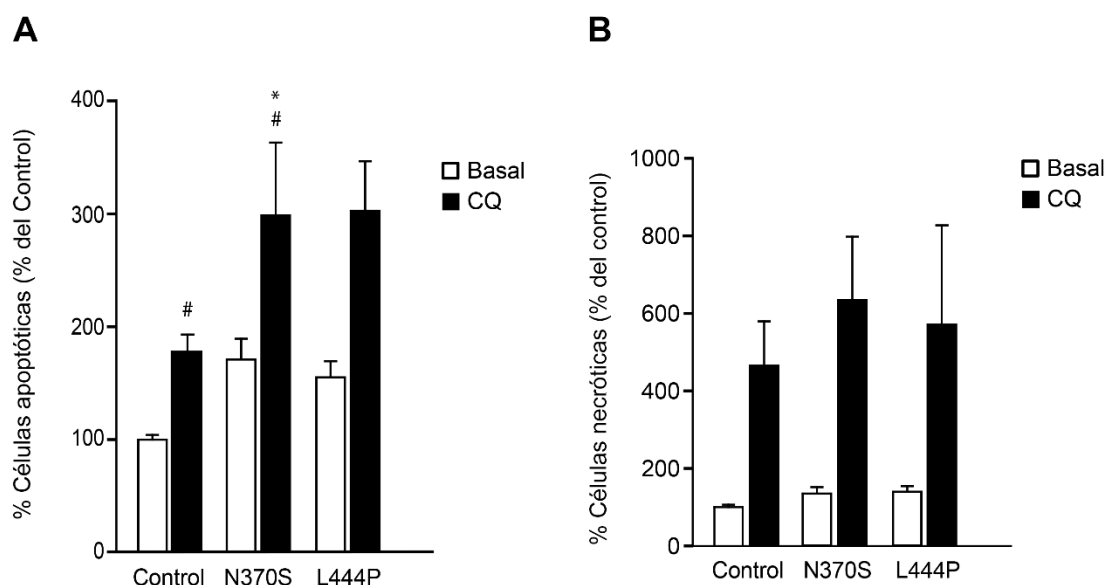


Figura 26. La cloroquina afecta más a la viabilidad de los fibroblastos mutantes. Análisis cuantitativo de citometría de flujo mostrando el porcentaje de células apoptóticas (A) y necróticas (B) en los fibroblastos tratados con CQ (50 μ M durante 4 h). Los datos representan la media \pm s.e.m de, al menos, tres experimentos independientes de todas las líneas celulares. *P < 0.05 vs controles; # P < 0.05 vs basales. Análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-hoc Bonferroni.

Aquí hemos demostrado que las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA1* en heterocigosis provocan una retención parcial de la GCasa1 en el RE. Esta retención produce estrés y desorganización del RE, así como fragmentación del AG, generando una disminución de la cantidad y actividad de la GCasa1 lisosomal. Esto conlleva una acumulación de colesterol en los lisosomas y disfunción de estos orgánulos, lo que favorece una autofagia ineficaz impidiendo la eliminación normal de mitocondrias dañadas, producción de ROS e incremento de la vulnerabilidad y muerte celular.

Discusión

La EP es una enfermedad neurodegenerativa compleja, producida por la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Bravo-San Pedro *et al.*, 2012; Kalia y Lang, 2015). A pesar de que su etiología continúa siendo desconocida, se sabe que la interacción de múltiples factores como son el ambiente, la edad y la genética aumentan la probabilidad de desarrollarla. Aunque durante mucho tiempo se ha considerado como un trastorno de origen esporádico, no genético, estudios recientes han demostrado la importancia de las contribuciones genéticas en la enfermedad (Lin y Ferrer, 2014). Estos estudios han establecido que los factores genéticos constituyen factores de susceptibilidad o modificadores de la enfermedad, afectando la penetrancia, la edad de inicio, la gravedad y la progresión de la misma. Aunque las mutaciones en el gen *GBA1* en heterocigosis son el factor de riesgo genético más importante para la EP (Sidransky y Lopez, 2012; Gegg y Schapira, 2018), los mecanismos moleculares que subyacen a la patogenicidad inducida por estas mutaciones continúan siendo desconocidos.

El gen *GBA1* codifica la enzima lisosomal GCase1, que se expresa de manera ubicua en todas las células del cuerpo. Por este motivo, en esta tesis hemos utilizado cultivos primarios de fibroblastos procedentes de enfermos parkinsonianos con las mutaciones N370S o L444P en heterocigosis en el gen *GBA1* como modelo celular de la EP. Numerosos estudios han utilizado fibroblastos humanos portadores de distintas mutaciones para investigar los mecanismos celulares y moleculares responsables de la degeneración dopaminérgica (Ambrosi *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2016; Grünwald *et al.*, 2010; Teves *et al.*, 2018; Yakhine-Diop *et al.*, 2018). Las principales ventajas de usar fibroblastos humanos como modelos *in vitro* de la EP son su disponibilidad y robustez genética. Son células accesibles, ya que se pueden aislar fácilmente a partir de biopsias cutáneas y proporcionar un modelo celular paciente-específico, conservando el envejecimiento cronológico y biológico de los pacientes, así como su etiopatología ambiental. Además, los fibroblastos mantienen la robustez genética tanto en cultivo como durante su conservación, siendo comparables a las líneas celulares establecidas y además, son susceptibles a la manipulación genética, por ejemplo, con construcciones lentivirales (Auburger *et al.*, 2012; Teves *et al.*, 2018).

1. Las mutaciones N370S y L444P en heterocigosis en el gen *GBA1* cambian la localización subcelular de la enzima GCasa1 alterando la estructura del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi

Nuestros datos demuestran que la disminución de los niveles de la enzima GCasa1 en el lisosoma, así como su actividad, no está causada por un fallo transcripcional, puesto que no hay diferencias en los niveles del ARNm entre los fibroblastos control y los mutantes. Estos resultados están en consonancia con los encontrados en otros estudios llevados a cabo utilizando diferentes modelos con las mismas mutaciones, ya sea en homocigosis en fibroblastos de pacientes con EG (Lu *et al.*, 2010) o en heterocigosis de pacientes con EP (McNeill *et al.*, 2014), así como en tejido cerebral (Gegg *et al.*, 2012) y en neuronas dopaminérgicas derivadas de iPSC (del inglés, *induced pluripotent stem cells*) procedentes de enfermos de Parkinson (Fernandes *et al.*, 2016; Schöndorf *et al.*, 2014).

Para conocer el origen de la disminución de los niveles de GCasa1 y determinar si existe un fallo postraduccional, estudiamos el proceso de maduración de la proteína. En concreto, hemos demostrado que la GCasa1 se encuentra parcialmente retenida en el RE de los fibroblastos mutantes, como indica el descenso en la colocación de las proteínas LAMP1 y GCasa1, así como la presencia de mayor fracción sensible a la enzima endo-H. Aunque no hemos demostrado el mecanismo por el cual las variantes L444P o N370S de la GCasa1 quedan retenidas en el RE, es posible que se deba a las modificaciones en la conformación tridimensional de la proteína causadas por las mutaciones. En concreto, estas modificaciones se generan por la sustitución de adenina por guanina (c.1226A>G) en el nucleótido 1226, que se traduce en el cambio de asparagina por serina en el aminoácido 370, en el caso de la mutación N370S, y de timina por citosina (c.1448T>C) en el nucleótido 1448 que se traduce en el cambio de leucina por prolina en el aminoácido 444, en el caso de la mutación L444P. El cambio en la estructura tridimensional de la GCasa1 podría hacer que no supere el control de calidad al que se someten las proteínas recién sintetizadas en el RE y que está implicado en el mantenimiento de la homeostasis de proteínas (Doyle *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2017). Además este cambio impide la correcta interacción de las variantes GCasa1 con su

transportador LIMP-2 (del inglés, *Lysosomal integral membrane protein-2*) en el RE y alcanzar su destino final que es el lisosoma (Reczek *et al.*, 2007; Rothaug *et al.*, 2014).

La perturbación de la homeostasis puede conducir al estrés del RE y activar el mecanismo de defensa UPR. La desorganización de la estructura del RE que encontramos en los fibroblastos mutantes junto con el incremento en la expresión de diferentes marcadores de estrés del RE y UPR confirma esta posibilidad. Además, nuestros resultados están en consonancia con otros estudios realizados en tejido cerebral de pacientes parkinsonianos o en neuronas dopaminérgicas derivadas de iPSC de pacientes con la EG o con la EP donde encuentran activada la vía UPR (Fernandes *et al.*, 2016; Gegg *et al.*, 2012; McNeill *et al.*, 2014; Sanchez-Martinez *et al.*, 2016). También, encontramos que la actividad de la enzima GCasa2, enzima que no está relacionada con el gen *GBA1*, está disminuida, lo cual está en línea con otros estudios llevados a cabo en modelos celulares de la EP con mutaciones en *GBA1* (Korschen *et al.*, 2013; Schondorf *et al.*, 2014). También la GCasa2 está localizada en el RE y probablemente la alteración de la homeostasis de este orgánulo esté contribuyendo al descenso de su actividad.

Es importante señalar que, aunque los fibroblastos con la mutación L444P, no presentan un incremento significativo en la expresión de los marcadores de estrés del RE y UPR, la ultraestructura de este orgánulo sí está alterada. Esta alteración puede deberse en parte, a que la variante L444P de la GCasa1 también está parcialmente retenida en RE. En cuanto a la diferente expresión de marcadores encontrada entre las dos mutaciones, puede deberse a una mayor involucración de los mecanismos de degradación asociados al proteasoma en el caso de la mutación L444P. En concreto, nosotros somos los primeros en demostrar que los niveles proteicos de la variante L444P de GCasa1 son menores que los de la N370S en la EP. Este descenso puede deberse a la activación de la vía ERAD (retrotranslocación de proteínas mal plegadas en el RE al citosol para su eliminación por el proteasoma) y la eliminación de la L444P- GCasa1 por el sistema UPS, como ocurre en fibroblastos de enfermos de Gaucher con esta mutación (Bendikov-Bar *et al.*, 2011). De hecho confirmamos la posible implicación del proteasoma al recuperar parcialmente los niveles proteicos de la GCasa1, sólo en las células L444P y no en las N370S, tras la inhibición de este complejo con Lactacistina.

En el caso de los fibroblastos N370S, probablemente el estrés prolongado del RE junto con la acumulación de la variante de GCasa1 termine inhibiendo el proteasoma, de forma similar a lo que ocurre cuando se inhibe farmacológicamente este complejo con el compuesto MG132. La inhibición con MG132 causa una acumulación de sustratos de la vía ERAD que se mantienen asociados de manera prolongada a chaperonas como BiP y calnexina dentro del RE. A medida que la acumulación de los sustratos ERAD se alarga en el tiempo, puede secuestrar más chaperonas y poner en riesgo el correcto plegamiento de las nuevas proteínas sintetizadas en el RE, retroalimentando positivamente el estrés del RE (Elkabetz *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 2003; Shaheen, 2018). En cambio, en el caso de las células L444P, aunque la retención de la GCasa1 en el RE provoque algunas alteraciones en el RE, probablemente no sea suficiente para desencadenar la respuesta UPR, debido a que existe una elevada tasa en su eliminación a través del proteasoma.

El RE y el AG son orgánulos que se encuentran conectados funcionalmente ya que están involucrados en el tráfico y transporte de las proteínas recién sintetizadas (Vitale y Pedrazzini, 2017). Nuestros hallazgos muestran que las mutaciones N370S y L444P producen una desorganización del AG, posiblemente como consecuencia de las alteraciones morfológicas del RE. Por tanto, las perturbaciones estructurales en el RE y en el AG podrían favorecer la retención de la GCasa1 en el RE, al verse afectado este tráfico. Esto no sólo afectaría el destino de la Gcasa1, sino que también multitud de proteínas nuevas no alcanzarían su destino celular, pudiendo verse afectados otros orgánulos y componentes celulares (Remondelli y Renna, 2017). El aumento del número de células con AG fragmentado que hemos encontrado, tanto en los fibroblastos N370S como los L444P, también se ha visto en tejido cerebral *postmortem* procedente de pacientes parkinsonianos (Fujita *et al.*, 2006) y se ha justificado como consecuencia de la agregación de la α -Syn (Lin *et al.*, 2009; Mazzulli *et al.*, 2016). Sin embargo, esta fragmentación parece ser un defecto primario en nuestros fibroblastos mutantes ya que éstos presentan niveles indetectables de α -Syn (Devine *et al.*, 2011; Hoepken *et al.*, 2008). Por ello, nuestro estudio demuestra que la integridad funcional de la GCasa1 es crítica para mantener la organización, no sólo del RE, sino también la del AG. Todos estos resultados sugieren que la GCasa1 mal plegada en el RE induce estrés de este orgánulo,

activa las vías ERAD y UPR y provoca una desorganización de la estructura del RE, causando a su vez, la fragmentación del AG. Todos estos procesos desempeñan un papel importante en la patogénesis de la EP.

2. Las mutaciones N370S y L444P en heterocigosis en el gen *GBA1* alteran el proceso de autofagia y la función lisosomal

A pesar de la demostración de que defectos en la autofagia pueden contribuir a la muerte neuronal en pacientes parkinsonianos con mutaciones en *GBA1* (Fernandes *et al.*, 2016; Schondorf *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017), los mecanismos esenciales responsables de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la EP siguen siendo desconocidos. Los estudios llevados a cabo en esta tesis nos han permitido comparar los efectos de cada una de las dos mutaciones (N370S o L444P) en el proceso de la autofagia, obteniendo resultados ligeramente diferentes en cada caso. En primer lugar, encontramos que, en condiciones de inducción de la autofagia (ya sea por privación de nutrientes o con el uso de rapamicina), el número de autofagosomas aumenta al incrementar el marcaje de LC3B-GFP, tanto en los fibroblastos control como en los mutantes. Esto indica que la presencia de las mutaciones N370S o L444P no impide el proceso de formación de los autofagosomas. No obstante, nuestros resultados muestran que los fibroblastos N370S tienen más autofagosomas que los controles, ya que presentan un aumento de las proteínas p62/SQSTM1 y LC3II en condiciones basales, como también se ha visto en otros modelos (Fernandes *et al.*, 2016; Schondorf *et al.*, 2014).

Además, el tratamiento con rapamicina potencia el aumento de los autofagosomas detectado con LC3B-GFP, y la Baf-A1, al impedir la fusión del autofagosoma con el lisosoma, produce también acumulación de autofagosomas detectada mediante LC3II y LC3B-GFP en los fibroblastos control y en los mutantes. De forma similar al tratamiento con rapamicina, esta acumulación está potenciada con respecto a las células control, lo que sugiere un flujo autofágico exacerbado. Con respecto a la regulación de la autofagia en condiciones basales, encontramos un descenso de p-mTOR en fibroblastos N370S, en línea con resultados obtenidos en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) deficientes en *Gba1* (Margalhaes *et al.*, 2016) y en tejido cerebral de ratones con la mutación L444P en heterocigosis (Li *et al.*, 2019). En los fibroblastos N370S, también encontramos un

incremento de Beclina1, similar al encontrado en neuronas derivadas de iPSC de pacientes parkinsonianos y en fibroblastos de pacientes con la EG (Fernandes *et al.*, 2016; de la Mata *et al.*, 2015). En conjunto, estos resultados indican que la autofagia esta exacerbada produciendo más cantidad de autofagosomas, demostrado por el aumento de p62/SQSTM1 en los fibroblastos N370S.

En cuanto a la mutación L444P hemos observado que, en condiciones basales, disminuye el número de autofagosomas, al contrario de lo que ocurre con la N370S. Este descenso, también se observa en cultivos de neuronas procedentes de ratones deficientes en *GBA1* y en células SH-SY5Y *knockdown* para el gen *GBA1* (Osellame *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2015). La disminución de los autofagosomas puede indicar un defecto en la formación de los mismos o que el flujo autofágico está inducido. Descartamos que la autofagia esté bloqueada porque los tratamientos con Baf-A1, privación de nutrientes o rapamicina producen un ligero incremento de los autofagosomas. Cabe destacar que estos tratamientos producen menos autofagosomas en los mutantes que en los controles. Este efecto inhibitorio sobre la inducción de autofagia concuerda con otros estudios en células SH-SY5 que sobreexpresan la misma variante (Li *et al.*, 2019). Además, resultados similares obtuvieron Pattison *et al.*, (2011) al silenciar el gen *Atg7* y añadir Baf-A1 en cultivos de cardiomiocitos de rata. Las proteínas ATG median la nucleación y elongación de los autofagosomas. En primer lugar, la proteína ATG7 es necesaria para la conjugación de las proteínas ATG5 y ATG12 y a su vez, el complejo ATG5-ATG12 y las proteínas ATG3 son necesarias para la conjugación del lípido fosfatidiletanolamina a LC3I y transformarlo en LC3II (Shimizu, 2018). Como la reducción de la expresión de cualquiera de estas proteínas conlleva la inhibición de la autofagia (Friedman *et al.*, 2012), es posible que existan alteraciones en los niveles de alguna/s de estas proteínas implicadas en estos primeros estadios de la formación de los autofagosomas en los fibroblastos L444P.

El incremento de p62/SQSTM1 en condiciones basales de los fibroblastos L444P concuerda con la posible inhibición de la síntesis de autofagosomas, es decir, puede que se acumulen componentes celulares marcados con p62/SQSTM1 que deberían ser degradados por la vía de la autofagia. Esta acumulación de p62/SQSTM1 también se ha observado en neuronas dopaminérgicas de ratones *KO* para el gen *Atg5* (Ren *et al.*,

2018). Además, la estabilidad de los niveles de p-mTOR tras la inducción de la autofagia estaría en línea con esta idea. Todos estos resultados sugieren que los fibroblastos con la mutación L444P podrían tener un defecto en la tasa de formación y/o en la maduración de los autofagosomas. A pesar de esto, estas células conservan la capacidad de regular la autofagia, aunque no en la misma medida que las células control o las N370S.

Como hemos visto anteriormente, tanto los fibroblastos N370S como los L444P presentan una acumulación de p62/SQSTM1 en condiciones basales medida por experimentos de WB e inmunocitoquímica, lo que podría indicar también que existe un fallo en la degradación lisosomal. La disminución en la actividad de las enzimas β -Gal y CatB que encontramos en ambos fibroblastos mutantes, como ocurre en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con EP y mutaciones en *GBA1* (Parnetti *et al.*, 2017), confirma la posible disfunción lisosomal. Este fallo en la degradación lisosomal probablemente sea consecuencia del descenso en la actividad GCasa1. Sin embargo, no encontramos cambios en la actividad de la enzima β -HexA lo que indica que la disfunción lisosomal no es completa. Además, la presencia de ambas mutaciones incrementa la masa lisosomal al encontrarse altos niveles de LAMP1 y mayor señal de LysoTracker® de manera similar a lo que se ha descrito en otros estudios (Fernandes *et al.*, 2016; Mazzulli *et al.*, 2016; Rothaug *et al.*, 2014; Schondorf *et al.*, 2014). Todo esto confirma que la disminución de los niveles de GCasa1 no se debe a un descenso en el número de lisosomas sino a un cambio de su localización subcelular, como hemos discutido anteriormente. El incremento en la masa lisosomal podría tratarse de un mecanismo para compensar su déficit funcional como se propone en otros modelos de la EP y la EG (Fernandes *et al.*, 2016; de la Mata *et al.*, 2015).

En esta tesis demostramos por vez primera que la presencia de las mutaciones N370S y L444P producen una acumulación de colesterol libre dentro de los lisosomas como muestran nuestros análisis de fluorescencia mediante tinción con Filipin III y nuestros experimentos de MET mediante la presencia de los CML. Así, se pone de manifiesto la existencia de una clara relación entre las mutaciones *GBA1* y la acumulación de colesterol en la EP. Además, puesto que se sabe que el deterioro lisosomal está involucrado en la patogénesis de la EP (Michel *et al.*, 2016) y que un alto

nivel de colesterol podría ser un marcador de lisosomas inmaduros (Takahashi *et al.*, 2012), el fallo en la función lisosomal que presentan nuestros fibroblastos mutantes podría también deberse a la acumulación de colesterol en los lisosomas. Por otro lado, ya se ha demostrado la importancia del colesterol en otros modelos relacionados directa o indirectamente con la GCasa1. En concreto, el almacenamiento de colesterol intracelular afecta la degradación ERAD durante la progresión de la EG (Ron y Horowitz, 2008), y en la enfermedad de NPC, su acumulación altera la actividad y estabilidad de la GCasa1 (Salvioli *et al.*, 2004).

La homeostasis del colesterol es crucial en diversos procesos como son, la organización de la membrana plasmática celular, puesto que mantiene su integridad y fluidez, la señalización celular o incluso la neurotransmisión (Franco *et al.*, 2018; Sarkar *et al.*, 2017). Por ello, cualquier alteración de las enzimas que están implicadas en el procesamiento o manipulación del colesterol es crucial y hay que tenerla en consideración, sobretudo en condiciones fisiopatológicas. En este sentido, aunque la presencia de colesterol ha sido ampliamente estudiada, la identificación y distribución de los derivados del colesterol en los compartimentos subcelulares y, lo que es más importante, su función, no se han estudiado en profundidad. Se ha confirmado que la GCasa1 tiene una segunda actividad catalítica, la glucosiltransferasa. Dicha actividad es reversible y consiste en una transglucosilación; es decir, la transferencia de un resto carbohidrato de glucocerebrósido al colesterol para formar el β -GlcCol (Akiyama *et al.*, 2013; Marques *et al.* 2016). Esta actividad refuerza el vínculo entre la función GCasa1 y el metabolismo del colesterol. Aunque la regulación *in vivo* de la transglucosilación sigue siendo desconocida, existen evidencias que muestran que la actividad hidrolítica de la GCasa1 promueve la degradación de β -GlcCol en condiciones no patológicas (Franco *et al.*, 2018). Por ello, las variantes L444P o N370S podrían contribuir al aumento anormal de los niveles de β -GlcCol, alterando las propiedades físicas de las membranas lisosómicas y como consecuencia, afectando su función.

Nosotros demostramos que el acúmulo del colesterol lisosomal también se produce en los fibroblastos control tratados con CQ, que inhibe el tráfico del colesterol al RE, acumulándose de forma anormal en los lisosomas. Cabe destacar que la CQ produce también la aparición de CML. En este sentido, hemos descrito, también por vez primera,

la asociación entre los CML y las mutaciones en *GBA1* en heterocigosis en la EP. Los CML son unos orgánulos celulares que acumulan de forma aberrante lípidos de origen lisosomal presentes en otras enfermedades de desórdenes lisosomales como Tay-Sachs, Fabry's o NPC (Lajoie *et al.*, 2005). Están formados por múltiples capas de membrana concéntricas, pudiendo contener entre otros lípidos, colesterol (Schmitz y Muller, 1991), lo que está en consonancia con el acúmulo de colesterol encontrado en nuestros fibroblastos mutantes. Nuestros resultados indican que las mutaciones en *GBA1* en heterocigosis alteran el tráfico normal del colesterol. Cuando el colesterol no está esterificado es trasladado al RE para su esterificación o a la red trans-Golgi y/o a la membrana plasmática para su expulsión fuera de la célula (Ikonen, 2008). Por lo tanto, la interrupción del correcto tráfico del colesterol en los fibroblastos mutantes podría ser otra de las causas de la alteración de la organización del RE y del AG que hemos encontrado.

La acumulación de colesterol en los lisosomas podría interferir el tráfico de proteínas y lípidos de membrana debido al papel que desempeña el colesterol en la regulación de la fluidez de la membrana y en el empaquetamiento de ésta en microdominios específicos (Maxfield y Tabas, 2005). Esto a su vez, podría desencadenar la alteración de la asociación de la α -Syn con estos microdominios lipídicos, ya que esta proteína puede interaccionar con lípidos de membrana como fosfolípidos, colesterol, gangliósidos y glucosilceramida, entre otros. Esta interacción de la α -Syn con los microdominios lipídicos de membrana es importante para la correcta función sináptica, puesto que la α -Syn desempeña un papel en el reciclaje y transmisión de las vesículas sinápticas en la terminal presináptica de las neuronas (Klein y Mazzulli, 2018). En línea con estos resultados, se ha demostrado que niveles de colesterol elevados promueven la agregación de α -Syn en células en cultivo (Eriksson *et al.*, 2017; van Maarschalkerweerd *et al.*, 2015), lo que sugiere la importancia del colesterol en la formación de los cuerpos de Lewy, característicos de la EP. Todo esto junto con estos resultados ponen de manifiesto que la acumulación del colesterol lisosomal es un factor clave en glicosfingolipidosis (Salvioli *et al.*, 2004; Sillence *et al.*, 2002) y en otras enfermedades caracterizadas por defectos en el tráfico de lípidos dentro del sistema endosoma-lisosoma (Bosco *et al.*, 2006; Salvioli *et al.*, 2004; Sillence *et al.*, 2002), entre

las que se incluye la EP. Además, la compleja regulación de la homeostasis del colesterol y su alta variación individual también podrían explicar la amplia diversidad de síntomas clínicos que comparten la EG, las sinucleopatías y la EP (Franco et al, 2018).

3. Alteración mitocondrial asociada a las mutaciones N370S y L444P en heterocigosis en el gen *GBA1*

La edad es uno de los principales factores de riesgo de la EP y en este sentido, una de las dianas principales son las mitocondrias, ya que el envejecimiento disminuye la capacidad celular de procesar la energía. Las mitocondrias son orgánulos esenciales para la producción de energía. Éstas son también necesarias para la regulación de importantes procesos metabólicos celulares como la homeostasis de calcio, la respuesta al estrés oxidativo causado por la producción de ROS mitocondriales y los procesos de muerte celular como la apoptosis o necrosis (Ribas *et al.*, 2014). De hecho, la disfunción mitocondrial está estrechamente ligada a la patogénesis de la EP y es considerada como el desencadenante tanto de los casos esporádicos como de los familiares (Larsen *et al.*, 2018). Los estudios de la pérdida de actividad de la enzima GCase1 en modelos celulares y animales han demostrado que esta deficiencia enzimática afecta a la función mitocondrial (Gegg y Schapira, 2016). Sin embargo, sigue sin estar claro cómo las mutaciones en *GBA1* en heterocigosis asociadas a la EP contribuyen a esta disfunción mitocondrial. La disfunción mitocondrial se caracteriza por la alteración de la cadena transportadora de electrones y del bombeo de protones por el sistema de fosforilación oxidativa, lo que disminuye el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), reduce la síntesis de ATP y aumenta el estrés oxidativo al aumentar la producción de ROS en la mitocondria (Moon y Paek, 2015). Como la disfunción mitocondrial aumenta la producción de ROS, es posible que el incremento de ROS observado en nuestros fibroblastos N370S y L444P sea un índice del mal funcionamiento de la mitocondria. Nuestros resultados son consistentes con los encontrados en otros modelos de la EP con mutaciones en *GBA1* y de la EG (Deganuto *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2019; McNeill *et al.*, 2014; Schondorf, *et al.*, 2018; Yun *et al.*, 2018).

En este contexto, la hipótesis que planteamos es que los fibroblastos mutantes podrían desarrollar una respuesta adaptativa para sobrevivir a los altos niveles de ROS. Nuestros resultados muestran que los fibroblastos mutantes aumentan su actividad antioxidante,

como indica el incremento en la transcripción y traducción de la enzima antioxidante SOD1. Sin embargo, ante la inducción de estrés oxidativo (tratamiento con tBHP) los fibroblastos mutantes son incapaces de sobre-activar su sistema antioxidante porque ya, en condiciones basales, han alcanzado el nivel máximo de inducción. Estos datos concuerdan con los experimentos de Wei *et al.*, (2008) realizados con fibroblastos derivados de pacientes con enfermedades de depósito lisosomal (EG y EP). Todo esto indica que los fibroblastos N370S o L444P han desarrollado una respuesta de activación del sistema antioxidante para compensar los altos niveles de ROS, sin embargo, esta respuesta es insuficiente para mantener los niveles de ROS por debajo del umbral tóxico.

Por otro lado, nuestros resultados de MET confirman la disfunción mitocondrial que presentan los fibroblastos mutantes. En concreto, las observaciones de la MET muestran alteraciones mitocondriales en los fibroblastos mutantes, manifestadas principalmente como mitocondrias más pequeñas, con perfiles agrandados y abultados. Esta morfología mitocondrial coincide con la observada en el cerebro de ratones modelo para la EG (Xu *et al.*, 2014), pero no con la de las neuronas dopaminérgicas derivadas de iPSC procedentes de dos pacientes gemelos con mutaciones en *GBA1* (Woodard *et al.*, 2014).

Para profundizar en las alteraciones de la morfología mitocondrial que detectamos por MET analizamos la red mitocondrial, utilizando los lentivirus mtDsRed. Este análisis se llevó a cabo sólo en los fibroblastos L444P por tener el ROS más elevado. Esta mutación produjo alteración de la red mitocondrial, con menor número de ramas por red y mayor número de fragmentos sin ningún tipo de ramificación. Estos cambios en la complejidad de la red mitocondrial, junto con la alteración del estado redox de las células L444P están en consonancia con los estudios en neuronas dopaminérgicas derivadas de iPSC de pacientes con EP y mutaciones en *GBA1* y otros modelos celulares. En estos estudios se establece que la disfunción mitocondrial de estas células está acompañada de cambios en la morfología de las mitocondrias, reducción de la respiración e incremento del estrés oxidativo (Li *et al.* 2019; Schondorf *et al.*, 2018). Las mitocondrias forman una red interconectada, lo que les permite comunicarse rápidamente y distribuir energía a través de la célula. La desventaja de esto es que esta conectividad pone en riesgo el sistema de conversión de energía, porque si alguno de los elementos se daña, puede poner en peligro toda la red. Las mitocondrias son

orgánulos dinámicos, que están fusionándose y dividiéndose continuamente (Bertholet *et al.*, 2016; Wilson *et al.*, 2013). El equilibrio dinámico entre los fenómenos de fusión y fisión determina la morfología de las mitocondrias permitiendo su adaptación a las necesidades energéticas. Por lo tanto, la mayor fragmentación mitocondrial de los fibroblastos L444P sugiere el desajuste del equilibrio de los fenómenos de fusión/fisión.

Mutaciones en genes que codifican proteínas relacionadas con la EP, como *SNCA*, *PINK1*, *PRKN*, *PARK7* y *LRRK2* están implicadas en la regulación de la fisión/fusión mitocondrial (Berthet *et al.*, 2014; Poole *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Yakhine-Diop *et al.*, 2018), lo que sugiere que alteraciones en la dinámica mitocondrial pueden contribuir a la neurodegeneración. Sin embargo, existe cierta controversia sobre si estos defectos mitocondriales son causa o consecuencia de esta neurodegeneración (Polyzos *et al.*, McMurray, 2017). Por otro lado, el equilibrio entre los procesos de fisión y fusión es importante también en la regulación de la de la mitofagia, eliminación de mitocondrias dañadas (Moon y Paek, 2015). El menor número de autofagosomas y en último término la degradación lisosomal aberrante que encontramos en los fibroblastos L444P, podría tener relación con esto. Nuestros datos sugieren que estas células tienen un déficit en la degradación de las mitocondrias como ocurre en otros modelos de EP con mutaciones en *GBA1* (Li *et al.* 2019; Osellame *et al.*, 2013; Schondorf *et al.*, 2018).

4. Las mutaciones N370S y L444P en el gen *GBA1* causan vulnerabilidad celular en fibroblastos procedentes de pacientes enfermos de Parkinson

Todas estas alteraciones, tanto funcionales como estructurales, podrían ser las causantes de la vulnerabilidad de los fibroblastos con mutaciones en heterocigosis en el gen *GBA1* a ciertos estímulos citotóxicos. En concreto, los fibroblastos mutantes son más vulnerables a la CQ puesto que aumenta el porcentaje de células apoptóticas, aunque sólo de manera significativa en los N370S. En general, la apoptosis inducida por CQ se debe al severo aumento del colesterol intracelular. Este aumento produce disfunción lisosomal y pérdida de la integridad de la membrana lisosomal, lo que lleva a la liberación de las catepsinas, y en último lugar, desencadena la señalización de muerte celular (King *et al.*, 2016). Mecanismos similares podrían explicar la vulnerabilidad celular asociada a las mutaciones N370S y L444P, teniendo en cuenta sus altos niveles de colesterol.

Cabe destacar en este contexto, que otro de los marcadores de estrés del RE que hemos analizado es CHOP. Cuando el estrés del RE es tan severo que ni siquiera puede reducirse por la activación de la UPR y por tanto, los niveles de proteínas mal plegadas siguen siendo altos, es cuando aparecen las propiedades pro-apoptóticas de CHOP. Esta proteína puede actuar regulando la expresión de genes pro- y anti-apoptóticos, como la inducción de la expresión de BIM o caspasa-3 (pro-apoptóticos) y la represión de Bcl-2 (anti-apoptótico) (Song *et al.*, 2017). Nuestros resultados sugieren que las células N370S podrían tener inducidas las señales de apoptosis puesto que presentan elevados niveles de CHOP, a diferencia de lo que ocurre en los fibroblastos L444P, donde no hay cambios.

Por otro lado, cuando la generación de ROS excede la capacidad reparativa de la célula, ésta sufre muerte necrótica o apoptótica (Redza-Dutordoir *et al.*, 2016) que es lo que podría estar pasando en nuestro modelo. En este contexto, los defectos de la red mitocondrial descritos anteriormente podrían reducir la generación de ATP y la energía celular, afectando su viabilidad. Mientras que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular con niveles normales de ATP, la necrosis ocurre con niveles de bajos de ATP (Szeto, 2006). Además, los niveles de ROS ejercen un efecto deletéreo en otras moléculas como las proteínas encargadas del metabolismo energético y los lípidos de membrana que sufren peroxidación lipídica. Una de las consecuencias del daño lipídico es la liberación del citocromo C a través de la membrana, iniciando la vía mitocondrial de la apoptosis (Hüttemann *et al.*, 2011).

En resumen, nuestros hallazgos indican que las mutaciones N370S y L444P cambian la localización subcelular de la GCasa1, lo que provoca estrés y desorganización del RE además de la acumulación de colesterol en los lisosomas. Esto podría alterar la autofagia, la disfunción mitocondrial y aumentar la vulnerabilidad celular (Fig. 27). Además, observamos que las mutaciones N370S y L444P producen efectos distintos en los mecanismos de eliminación de proteínas dañadas, como la mayor tasa de eliminación de la variante L444P por ERAD/UPS y menos autofagosomas que en la N370S. Estos resultados son importantes para validar los fibroblastos de pacientes como excelente modelo celular paciente-específico, accesible y robusto de la EP. A pesar de la naturaleza no neuronal del modelo, nuestros datos proporcionan un marco para comprender los mecanismos de la EP vinculada a *GBA1*, y demuestran que la pérdida de

la actividad GCasa1 es suficiente para causar daño celular, incluso en ausencia de α -Syn, lo que sugiere que este tipo de EP comparte características neurodegenerativas comunes con enfermedades debidas a alteración en el almacenamiento de lípidos.

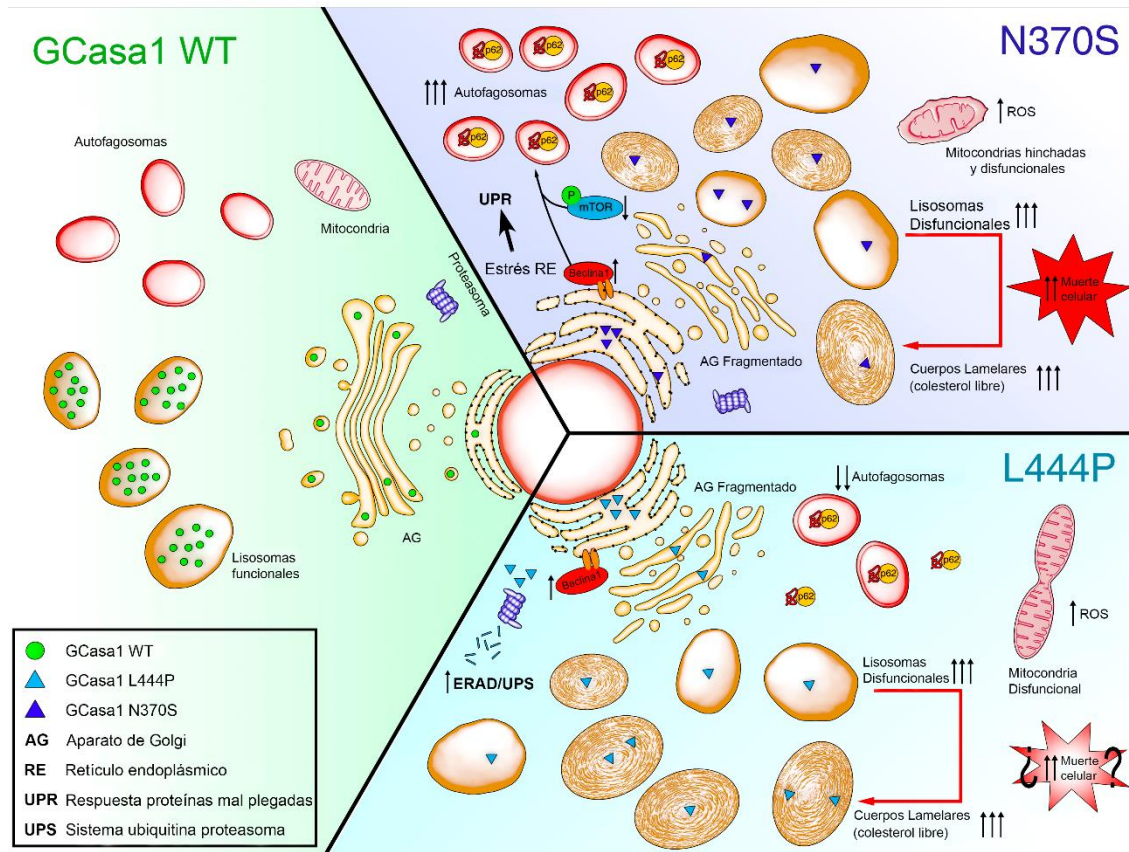


Figura 27. Diagrama esquemático que resume las principales alteraciones encontradas en los fibroblastos procedentes de enfermos de Parkinson con las mutaciones N370S o L444P en el gen *GBA1*. Estas mutaciones reducen la actividad de la GCasa1 en los lisosomas debido a su retención en el RE, lo que a su vez produce estrés, agrandamiento y desorganización del RE y del AG. La tasa de eliminación de la GCasa1 L444P por la vía ERAD/UPS es mayor que la de la variante N370S. Hay más acumulación de autofagosomas en las células N370S y menos en las L444P con respecto a los controles. La proteína p62/SQSTM1 se acumula en ambos fibroblastos mutantes debido a la disfunción lisosomal, probablemente a causa de la acumulación de colesterol (cuerpos multilamelares, CML). Estas alteraciones favorecen la eliminación anormal del daño mitocondrial, la producción de ROS y aumentan la vulnerabilidad celular.

5. Importancia biológica de los defectos celulares y moleculares asociados a las mutaciones en *GBA1* en la enfermedad de Parkinson

Las neuronas son células caracterizadas por su alta demanda energética. El metabolismo neuronal se fundamenta principalmente en la producción mitocondrial de

ATP, ya que no pueden depender de la glucólisis. Las neuronas son particularmente sensibles a la disfunción mitocondrial ya que la eliminación de las mitocondrias dañadas previene su la acumulación y la muerte celular (Moon y Paek, 2015). Además, el transporte de las mitocondrias a las sinapsis donde hay una alta demanda energética es esencial para la viabilidad neuronal. Las neuronas dopaminérgicas son más susceptibles al estrés oxidativo por su elevado metabolismo energético y por su alta generación de ROS debido a las múltiples vías de oxidación dopaminérgica en el citosol (Ares-Santos *et al.*, 2012; Esposito *et al.*, 2007). Además, debido a la longitud y la complejidad de su arquitectura axonal, con más 150.000 terminales en el estriado, las neuronas dopaminérgicas requieren una alta demanda energética para mantener su función biológica (Pissadaki y Bolam, 2013). Estas características morfológicas las hacen especialmente susceptibles al desequilibrio energético. Así, la disfunción lisosomal, mitocondrial y el estrés del RE provocados por mutaciones *GBA1* puede inducir la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas.

Conclusiones

1. Los fibroblastos que portan las mutaciones N370S o L444P en el gen *GBA1* en heterocigosis presentan una disminución en los niveles de la proteína GCasa1, siendo menores los de las células L444P que los de las N370S.
2. Los fibroblastos mutantes disminuyen la actividad GCasa1.
3. Las mutaciones N370S y L444P producen retención parcial de la GCasa1 en el retículo endoplásmico provocando desorganización del retículo y del aparato de Golgi.
4. Los fibroblastos N370S presentan estrés del retículo y una activación de la vía UPR, mientras que los de la L444P tienen mayor degradación por la vía UPS.
5. Los fibroblastos con la mutación N370S presentan una mayor cantidad de autofagosomas debido a una autofagia exacerbada. En cambio, los fibroblastos L444P tienen una disminución de autofagosomas debido a un defecto en la tasa de formación.
6. Las mutaciones N370S y L444P en *GBA1* provocan disfunción lisosomal y un incremento en masa lisosomal.
7. Los fibroblastos mutantes acumulan colesterol libre en los lisosomas y cuerpos multilamelares, debido al descenso de la actividad de la GCasa1.
8. Las mutaciones N370S y L444P incrementan los niveles de especies reactivas de oxígeno y en la expresión proteínas implicadas en el sistema antioxidante.
9. Las mutaciones N370S y L444P alteran la ultraestructura de las mitocondrias y además la mutación L444P también produce modificaciones en la complejidad de la red mitocondrial.
10. Los fibroblastos con la mutación N370S son más vulnerables al estímulo citotóxico de la cloroquina

Bibliografía

- Abeliovich A and Gitler A (2016) 'Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics', *Nature*, 539(7628):207–216.
- Akiyama H, Kobayashi S, Hirabayashi Y, Murakami-Murofushi K (2013) 'Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of β -glucosidase 1', *Biochem Biophys Res Commun*, 441(4):838–843.
- Albin RL, Young AB and Penney JB (2018) 'The functional anatomy of basal ganglia disorder', *Trends Neurosci*, 109(6):700–706.
- Ambrosi G, Ghezzi C, Sepe S, Milanese C, Payan-Gomez C, Bombardieri CR, Armentero MT, Zangaglia R, Pacchetti C, Mastroberardino PG, Blandini F (2014) 'Bioenergetic and proteolytic defects in fibroblasts from patients with sporadic Parkinson's disease', *Biochim Biophys Acta*, 1842(9):1385–1394.
- Ares-Santos S, Granado N, Oliva I, O'Shea E, Martin ED, Colado MI, Moratalla R (2012) 'Dopamine D1 receptor deletion strongly reduces neurotoxic effects of methamphetamine', *Neurobiol Dis*, 45(2):810–820.
- Auburger G, Klinkenberg M, Drost J, Marcus K, Morales-Gordo B, Kunz WS, Brandt U, Broccoli V, Reichmann H, Gispert S, Jendrach M (2012) 'Primary skin fibroblasts as a model of Parkinson's disease', *Mol Neurobiol*, 46(1):20–27.
- Beavan MS and Schapira AH (2013) 'Glucocerebrosidase mutations and the pathogenesis of Parkinson disease', *Ann Med*, 45(8):511–521.
- Benbrook DM and Long A (2012) 'Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis', *Exp Oncol*, 34(3):286–297.
- Bendikov-Bar I, Ron I, Filocamo M, Horowitz M (2011) 'Characterization of the ERAD process of the L444P mutant glucocerebrosidase variant', *Blood Cells Mol Dis*, 46(1):4–10.
- Bendikov-Bar I and Horowitz M (2012) 'Gaucher disease paradigm: From ERAD to comorbidity', *Hum Mutat*, 33(10):1398–1407.
- Berthet A, Margolis EB, Zhang J, Hsieh I, Zhang J, Hnasko TS, Ahmad J, Edwards RH, Sesaki H, Huang EJ, Nakamura K (2014) 'Loss of Mitochondrial Fission Depletes Axonal Mitochondria in Midbrain Dopamine Neurons', *J Neurosci*, 34(43):14304–14317.
- Bertholet AM, Delerue T, Millet AM, Moulis MF, David C, Daloyau M, Arnauné-Pelloquin L, Davezac N, Mils V, Miquel MC, Rojo M, Belenguer P (2016) 'Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity', *Neurobiol Dis*, 90:3–19.
- Billingsley KJ and Singleton AB (2018) 'Genetic Risk Factors in Parkinson's Disease', *Cell Tissue Res*, 373(1):9–20.
- Bosco DA, Fowler DM, Zhang Q, Nieva J, Powers ET, Wentworth P Jr, Lerner RA, Kelly JW (2006) 'Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization', *Nat Chem Biol*, 2(5):249–253.
- Boya, P, Reggiori F and Codogno P (2013) 'Emerging regulation and functions of autophagy', *Nat Cell Biol*, 15(7):713–720.

- Bravo-San Pedro JM, Niso-Santano M, Gómez-Sánchez R, Pizarro-Estrella E, Aiastui-Pujana A, Gorostidi A, Climent V, López de Maturana R, Sanchez-Pernaute R, López de Munain A, Fuentes JM, González-Polo RA (2013) 'The LRRK2 G2019S mutant exacerbates basal autophagy through activation of the MEK/ERK pathway', *Cell Mol Life Sci*, 70(1):121–136.
- Burbulla LF, Song P, Mazzulli JR, Zampese E, Wong YC, Jeon S, Santos DP, Blanz J, Obermaier CD, Strojny C, Savas JN, Kiskinis E, Zhuang X, Krüger R, Surmeier DJ, Krainc D (2017) 'Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease', *Science*, 357(6357):1255–1231.
- Campdelacreu J (2014) 'Parkinson's disease and Alzheimer disease: environmental risk factors', *Neurología (English Edition)*, 29(9):541–549.
- Chaudhuri KR, Healy DG and Schapira AH (2006) 'Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management', *Lancet Neurol*, 5(3):235–45.
- Chen CS, Patterson MC, Wheatley CL, O'Brien JF, Pagano RE (1999) 'Broad screening test for sphingolipid-storage diseases', *Lancet*, 354(9182):901-905.
- Chen Y and Dorn GW (2013) 'PINK1-Phosphorylated Mitofusin 2 Is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria', *Science*, 340(6131):471–475.
- Cicchini M, Karantza V and Xia B (2015) 'Molecular Pathways: Autophagy in Cancer—A Matter of Timing and Context', *Clin Cancer Res*, 21(3):498–504.
- Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L (2004) 'OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(45):15927–15932.
- Clayton KB, Podlesniy P, Figueiro-Silva J, López-Doménech G, Benitez L, Enguita M, Abad MA, Soriano E, Trullas R (2012) 'NP1 Regulates Neuronal Activity-Dependent Accumulation of BAX in Mitochondria and Mitochondrial Dynamics', 32(4):1453–1466.
- Cleeter MW, Chau KY, Gluck C, Mehta A, Hughes DA, Duchon M, Wood NW, Hardy J, Mark Cooper J, Schapira AH (2013) 'Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage', *Neurochem Int*, 62(1):1–7.
- Cortes CJ and La Spada AR (2019) 'TFEB dysregulation as a driver of autophagy dysfunction in neurodegenerative disease: Molecular mechanisms, cellular processes, and emerging therapeutic opportunities', *Neurobiol Dis*, 122:83–93.
- Cullen V, Sardi SP, Ng J, Xu YH, Sun Y, Tomlinson JJ, Kolodziej P, Kahn I, Saftig P, Woulfe J, Rochet JC, Glicksman MA, Cheng SH, Grabowski GA, Shihabuddin LS, Schlossmacher MG (2011) 'Acid β -glucosidase mutants linked to gaucher disease, parkinson disease, and lewy body dementia alter α -synuclein processing', *Ann Neurol*, 69(6):940–953.
- Decressac M, Mattsson B, Weikop P, Lundblad M, Jakobsson J, Björklund A (2013) 'TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(19):E1817–E1826.

Deganuto M, Pittis MG, Pines A, Dominissini S, Kelley MR, Garcia R, Quadrifoglio F, Bembi B, Tell G (2007) 'Altered Intracellular Redox of Adaptive Response Against Fibroblasts and Impairment Status in Gaucher Disease Oxidative Stress', *J Cell Physiol*, 212(1):223–235.

Dehay B, Bové J, Rodríguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, Vila M (2010) 'Pathogenic Lysosomal Depletion in Parkinson's Disease', *J Neurosci*, 30(37), pp. 12535–12544.

Dehay B, Martinez-Vicente M, Caldwell GA, Caldwell KA, Yue Z, Cookson MR, Klein C, Vila M, Bezdard E (2013) 'Lysosomal impairment in Parkinson's disease', *Mov Disord*, 28(6):725–732.

Devine MJ, Gwinn K, Singleton A, Hardy J (2011) 'Parkinson's Disease and α -synuclein Expression', *Mov Disord*, 26(12):2160–2168.

Dexter DT and Jenner P (2013) 'Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms', *Free Radic Biol Med*, 62:132–144.

Dias V, Junn E and Mouradian MM (2013) 'The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease', *J Parkinsons Dis*, 3(4):461–491.

Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I (2009) 'Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria', *Lancet Neurol*, 8(12):1150–1157.

Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM (2007) 'Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030', *Neurology*, 68(5):384–386.

Du TT, Wang L, Duan CL, Lu LL, Zhang JL, Gao G, Qiu XB, Wang XM, Yang H (2015) 'GBA deficiency promotes SNCA/ α -synuclein accumulation through autophagic inhibition by inactivated PPP2A', *Autophagy*, 11(10):1803–1820.

Dvir H, Harel M, McCarthy AA, Toker L, Silman I, Futerman AH, Sussman JL (2003) 'X-ray structure of human acid- β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease', *EMBO Rep*, 4(7):704–709.

Elkabetz Y, Shapira I, Rabinovich E, Bar-Nun S (2004) 'Distinct steps in dislocation of luminal endoplasmic reticulum-associated degradation substrates. Roles of endoplasmic reticulum-bound p97/Cdc48p and proteasome', *J Biol Chem*, 279(6):3980–3989.

Enquist IB, Lo Bianco C, Ooka A, Nilsson E, Månsson JE, Ehinger M, Richter J, Brady RO, Kirik D, Karlsson S (2007) 'Murine models of acute neuronopathic Gaucher disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(44):17483–17488.

Esposito E, Di Matteo V, Di Giovanni G (2007) 'Death in the substantia nigra: a motor tragedy', *Expert Rev Neurother*, 7(6):677–97.

Fernandes HJ, Hartfield EM, Christian HC, Emmanouilidou E, Zheng Y, Booth H, Bogetofte H, Lang C, Ryan BJ, Sardi SP, Badger J, Vowles J, Evetts S, Tofaris GK, Vekrellis K, Talbot

K, Hu MT, James W, Cowley SA, Wade-Martins R (2016) 'ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular α -Synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-Derived Dopamine Neurons', *Stem Cell Reports*, 6(3):342–356.

Forno LS (1996) 'Neuropathology of Parkinson's disease', *J Neuropathol Exp Neurol*, 55(3):259-72.

Franco-Iborra S, Vila M and Perier C (2018) 'Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases: Focus on Parkinson's disease and Huntington's disease', *Front Neurosci*, 12:342 doi: 10.3389/fnins.2018.00342.

Franco R, Sánchez-Arias JA, Navarro G, Lanciego JL (2018) 'Glucocerebrosidase Mutations and Synucleinopathies. Potential Role of Sterylglucosides and Relevance of Studying Both GBA1 and GBA2 Genes', *Front Neuroanat*, 12:52 doi: 10.3389/fnana.2018.00052.

Friedman LG, Lachenmayer ML, Wang J, He L, Poulouse SM, Komatsu M, Holstein GR, Yue Z (2012) 'Disrupted Autophagy Leads to Dopaminergic Axon and Dendrite Degeneration and Promotes Presynaptic Accumulation of α -Synuclein and LRRK2 in the Brain', *J Neurosci*, 32(22):7585–7593.

Fujita Y, Ohama E, Takatama M, Al-Sarraj S, Okamoto K (2006) 'Fragmentation of Golgi apparatus of nigral neurons with α -synuclein-positive inclusions in patients with Parkinson's disease', *Acta Neuropathol*, 112(3):261–265.

Gallegos S, Pacheco C, Peters C, Opazo CM, Aguayo LG (2015) 'Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease', *Front Neurosci*, 9:59 doi: 10.3389/fnins.2015.00059.

Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, . . . , Kroemer G (2018) 'Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018', *Cell Death Differ*, 25(3):486–541.

Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K, Downward J, Latchman DS, Tabrizi SJ, Wood NW, Duchen MR, Abramov AY (2009) 'PINK1-Associated Parkinson's Disease Is Caused by Neuronal Vulnerability to Calcium-Induced Cell Death', *Mol Cell*, 33(5):627–638.

Gautier CA, Kitada T and Shen J (2008) 'Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(32):11364–11369.

Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW (2010) 'Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy', *Hum Mol Genet*, 19(24):4861–4870.

Gegg ME, Burke D, Heales SJ, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, Schapira AH (2012) 'Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains', *Ann Neurol*, 72(3):455–463.

Gegg ME, Sweet L, Wang BH, Shihabuddin LS, Sardi SP, Schapira AH (2015) 'No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations', *Mov Disord*, 30(8):1085–1089.

- Gegg ME and Schapira AH (2018) 'The role of glucocerebrosidase in Parkinson disease pathogenesis', *FEBS J*, 285(19):3591–3603.
- Glauser L, Sonnay S, Stafa K, Moore DJ (2011) 'Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1', *J Neurochem*, 118(4):636–645.
- Goker-Alpan O, Stubblefield BK, Giasson BI, Sidransky E (2010) 'Glucocerebrosidase is present in α -synuclein inclusions in Lewy body disorders', *Acta Neuropathol*, 120(5):641–649.
- Gómez-Suaga P, Fdez E, Fernández B, Martínez-Salvador M, Blanca Ramírez M, Madero-Pérez J, Rivero-Ríos P, Fuentes JM, Hilfiker S (2014) 'Novel insights into the neurobiology underlying LRRK2-linked Parkinson's disease', *Neuropharmacology*, 85:45–56.
- Grabowski GA, Gatt S and Horowitz M (1990) 'Acid β -Glucosidase: Enzymology and Molecular Biology of Gaucher Disease', *Biochem Mol Biol*, 25(6):385–414.
- Grabowski GA (2008) 'Lysosomal Storage Disease 1 Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease', *Lancet*, 372(9645):1263–1271.
- Grünewald A, Arns B, Seibler P, Rakovic A, Münchau A, Ramirez A, Sue CM, Klein C (2012) 'ATP13A2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with Kufor-Rakeb syndrome', *Neurobiol Aging*, 33(8):1843.e1–7.
- Guo F, Liu X, Cai H, Le W (2018) 'Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy', *Brain Pathol*, 28(1):3–13.
- Halliday G, Lees A and Stern M (2011) 'Milestones in Parkinson's disease-Clinical and pathologic features', *Mov Disord*, 26(6):1015–1021.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (1984) 'Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease', *Biochem J*, 219(1):1–14.
- Helenius A and Aebi M (2004) 'Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum', *Annu Rev Biochem*, 73:1019–1049.
- Hernán MA, Takkouche B, Caamaño-Isorna F, Gestal-Otero JJ (2002) 'A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease', *Ann Neurol*, 52(3):276–284.
- Hoepken HH, Gispert S, Azizov M, Klinkenberg M, Ricciardi F, Kurz A, Morales-Gordo B, Bonin M, Riess O, Gasser T, Kögel D, Steinmetz H, Auburger G (2008) 'Parkinson patient fibroblasts show increased alpha-synuclein expression', *Exp Neurol*, 212(2):307–313.
- Houlden H and Singleton AB (2012) 'The genetics and neuropathology of Parkinson's disease', *Acta Neuropathol*, 124(3):325–338.
- Hüttemann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson TH, Kagan VE, Samavati L, Doan JW, Lee I (2011) 'The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: from respiration to apoptosis', *Mitochondrion*, 11(3):369–381.

- Ikonen E (2008) 'Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2):125–138.
- Jaeger PA and Coray TW (2009) 'All-you-can-eat: Autophagy in neurodegeneration and neuroprotection', *Mol Neurodegener*, 4:16 doi: 10.1186/1750-1326-4-16.
- Lu J, Chiang J, Iyer RR, Thompson E, Kaneski CR, Xu DS, Yang C, Chen M, Hodes RJ, Lonser RR, Brady RO, Zhuang Z (2010) 'Decreased glucocerebrosidase activity in Gaucher disease parallels quantitative enzyme loss due to abnormal interaction with TCP1 and c-Cbl', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(50):21665–21670.
- Johansen T and Lamark T (2011) 'Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins', *Autophagy*, 7(3):279–296.
- Kalia LV and Lang AE (2015) 'Parkinson's disease', *Lancet*, 386(9996):896–912.
- Kazlauskaitė A, Kondapalli C, Gourlay R, Campbell DG, Ritorto MS, Hofmann K, Alessi DR, Knebel A, Trost M, Muqit MM (2014) 'Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65', *Biochem J*, 460(1):127–141.
- Kilpatrick BS, Magalhaes J, Beavan MS, McNeill A, Gegg ME, Cleeter MW, Bloor-Young D, Churchill GC, Duchen MR, Schapira AH, Patel S (2016) 'Endoplasmic reticulum and lysosomal Ca²⁺ stores are remodelled in GBA1-linked Parkinson disease patient fibroblasts', *Cell Calcium*, 59(1):12–20.
- Kim I, Xu W and Reed JC (2008) 'Cell death and endoplasmic reticulum stress: Disease relevance and therapeutic opportunities', *Nat Rev Drug Discov*, 7(12):1013–1030.
- King MA, Ganley IG and Flemington V (2016) 'Inhibition of cholesterol metabolism underlies synergy between mTOR pathway inhibition and chloroquine in bladder cancer cells', *Oncogene*, 35(34):4518–4528.
- Klein AD and Mazzulli JR (2018) 'Is Parkinson's disease a lysosomal disorder?', *Brain*, 141(8):2255–2262.
- Konno T, Ross OA, Puschmann A, Dickson DW, Wszolek ZK (2016) 'Autosomal dominant Parkinson's disease caused by SNCA duplications', *Parkinsonism Relat Disord*, 22:S1–S6 doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.09.007.
- Körschen HG, Yildiz Y, Raju DN, Schonauer S, Bönigk W, Jansen V, Kremmer E, Kaupp UB, Wachten D (2013) 'The non-lysosomal β -glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi', *J Biol Chem*, 288(5):3381–3393.
- Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon EA, Trempe JF, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N (2014) 'Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin', *Nature*, 510(7503):162–166.
- Kuusisto E, Salminen A and Alafuzoff I (2001) 'Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies', *Neuroreport*, 12(10):2085–2090.

- Kurzawa-Akanbi M, Hanson PS, Blain PG, Lett DJ, McKeith IG, Chinnery PF, Morris CM (2012) 'Glucocerebrosidase Mutations alter the endoplasmic reticulum and lysosomes in Lewy body disease', *J Neurochem*, 123(2):298–309.
- de la Mata M, Cotán D, Oropesa-Ávila M, Garrido-Maraver J, Cordero MD, Villanueva Paz M, Delgado Pavón A, Alcocer-Gómez E, de Laveria I, Ybot-González P, Paula Zaderenko A, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Sánchez-Alcázar JA (2015) 'Pharmacological Chaperones and Coenzyme Q10 Treatment Improves Mutant β -Glucocerebrosidase Activity and Mitochondrial Function in Neuronopathic Forms of Gaucher Disease', *Sci Rep*, 5:10903 doi: 10.1038/srep10903.
- Lajoie P, Guay G, Dennis JW, Nabi IR. (2005) 'The lipid composition of autophagic vacuoles regulates expression of multilamellar bodies', *J Cell Sci*, 118(9):1991–2003.
- Lanciego JL, Luquin N and Obeso JA (2012) 'Functional neuroanatomy of the basal ganglia', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(12):a009621 doi: 10.1101/cshperspect.a009621.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) 'Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis', *Science*, 219(4587):979–980.
- Larsen SB, Hanss Z and Krüger R (2018) 'The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease', *Cell and Tissue Res*, 373(1):21–37.
- Lesage S and Brice A (2009) 'Parkinson's disease: From monogenic forms to genetic susceptibility factors', *Hum Mol Genet*, 18(R1):R48–59.
- Li H, Ham A, Ma TC, Kuo SH, Kanter E, Kim D, Ko HS, Quan Y, Sardi SP3, Li A, Arancio O, Kang UJ, Sulzer D, Tang G (2019) 'Mitochondrial dysfunction and mitophagy defect triggered by heterozygous GBA mutations', *Autophagy*, 15(1):113–130.
- Lieberman RL (2007) 'Structure of acid beta-glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease', *Nat Chem Biol*, (2):101-107.
- Lieberman RL (2009) 'Effects of pH and iminosugar pharmacological chaperones on lysosomal glycosidase structure and stability', *Biochemistry*, 48(22):4816-27.
- Lieberman RL (2011) 'A Guided Tour of the Structural Biology of Gaucher Disease: Acid- β -Glucosidase and Saposin C', *Enzyme Res*, 2011: 973231 doi: 10.4061/2011/973231.
- Lin MK and Farrer MJ (2014) 'Genetics and Genomics of Parkinson's Disease', *Genome Med*, 6(6):48. doi: 10.1016/B978-0-12-374934-5.00054-4.
- Lin MT and Beal MF (2006) 'Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases', *Nature*, 443(7113):787–795.
- Linder MD, Uronen RL, Hölttä-Vuori M, van der Sluijs P, Peränen J, Ikonen E (2007) 'Rab8-dependent Recycling Promotes Endosomal Cholesterol Removal in Normal and Sphingolipidosis Cells', *Mol Biol Cell*, 18(1):47-56.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method', *Methods*, 25(4):402–408.

- Losón OC, Song Z, Chen H, Chan DC (2013) 'Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission', *Mol Biol Cell*, 24(5):659–667.
- Lotharius J and Brundin P (2002) 'Pathogenesis of Parkinson's disease: Dopamine, vesicles and α -synuclein', *Nat Rev Neurosci*, 3(12):932–942.
- Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky DJ (2012) 'The Role of Autophagy in Parkinson's Disease', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(4):a009357 doi: 10.1101/cshperspect.a009357.
- Maegawa GH, Tropak MB, Buttner JD, Rigat BA, Fuller M, Pandit D, Tang L, Kornhaber GJ, Hamuro Y, Clarke JT, Mahuran DJ. (2009) 'Identification and Characterization of Ambroxol as an Enzyme Enhancement Agent for Gaucher Disease', *J Biol Chem*, 284(35):23502–23516.
- Magalhaes J, Gegg ME, Migdalska-Richards A, Doherty MK, Whitfield PD, Schapira AH (2016) 'Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: Relevance to Parkinson disease', *Hum Mol Genet*, 25(16):3432–3445.
- Magalhaes J, Gegg ME, Migdalska-Richards A, Schapira AH (2018) 'Effects of ambroxol on the autophagy-lysosome pathway and mitochondria in primary cortical neurons', *Sci Rep*, 8(1):1385 doi: 10.1038/s41598-018-19479-8.
- Maor G, Rapaport D and Horowitz M (2019) 'The effect of mutant GBA1 on accumulation and aggregation of α -synuclein.', *Hum Mol Genet*, doi: 10.1093/hmg/ddz005.
- Marques AR, Mirzaian M, Akiyama H, . . . , Aerts JM (2016) 'Glucosylated cholesterol in mammalian cells and tissues: formation and degradation by multiple cellular β -glucosidases', *J Lipid Res*, 57(3):451–463.
- Mata IF, Leverenz JB, Weintraub D, . . . , Zabetian CP (2016) 'GBA variants are associated with a distinct pattern of cognitive deficits in Parkinson disease', *Mov Disord*, 31(1):95–102.
- Maxfield FR and Tabas I (2005) 'Role of cholesterol and lipid organization in disease', *Nature*, 438(7068):612–621.
- Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, Sidransky E, Grabowski GA, Krainc D (2011) 'Gaucher's Disease Glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies', *Cell*, 146(1):37–52.
- Mazzulli JR, Zunke F, Isacson O, Studer L, Krainc D (2016) ' α -Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(7):1931–1936.
- McNeill A, Magalhaes J, Shen C, Chau KY, Hughes D, Mehta A, Foltynie T, Cooper JM, Abramov AY, Gegg M, Schapira AH (2014) 'Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells', *Brain*, 137(5):1481–1495.
- Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P (2010) 'Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells', *Cell Res*, 20(7):748–762.

- Michel PP, Hirsch EC and Hunot S (2016) 'Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease', *Neuron*, 90(4):675–691.
- Migdalska-Richards A and Schapira AH (2016) 'The relationship between glucocerebrosidase mutations and Parkinson disease', *J Neurochem*, 139 Supp 1:77–90.
- Minakaki G, Menges S, Kittel A, . . . , Klucken J (2018) 'Autophagy inhibition promotes SNCA/alpha-synuclein release and transfer via extracellular vesicles with a hybrid autophagosome-exosome-like phenotype', *Autophagy*, 14(1), pp. 98–119.
- Moharram R, Maynard D, Wang ES, Makusky A, Murray GJ, Martin BM (2006) 'Reexamination of the cysteine residues in glucocerebrosidase', *FEBS Lett*, 580(14):3391–3394.
- Moon HE and Paek SH (2015) 'Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease', *Exp Neurobiol*, 24(2), pp. 103–116.
- Moors TE, Hoozemans JJ, Ingrassia A, Beccari T, Parnetti L, Chartier-Harlin MC, van de Berg WD (2017) 'Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease', *Mol Neurodegener*, 12(1):11 doi: 10.1186/s13024-017-0154-3.
- Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E, Cooper A, Garner B, Halliday GM (2014) 'Reduced glucocerebrosidase is associated with increased α -synuclein in sporadic Parkinson's disease', *Brain*, 137(3):834–848.
- Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, Reches A, Bembi B, Zimran A (1996) 'Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease', *QJM*, 89(9):691-694.
- Oda Y, Hosokawa N, Wada I, Nagata K (2003) 'EDE1 as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin', *Science*, 299(5611):1394–1397.
- Osellame LD, Rahim AA, Hargreaves IP, Gegg ME, Richard-Londt A, Brandner S, Waddington SN, Schapira AH, Duchon MR (2013) 'Mitochondria and Quality Control Defects in a Mouse Model of Gaucher Disease--Links to Parkinson's Disease', *Cell Metab*, 17(6):941–953.
- Osowski CM and Urano F (2011) 'Measuring ER stress and the UPR using mammalian tissue culture system', *Methods Enzymol*, 490:71–92.
- Palikaras K and Tavernarakis N (2014) 'Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis', *Exp Gerontol*, 56:182–188.
- Parkinson-Lawrence EJ, Shandala T, Prodoehl M, Plew R, Borlace GN, Brooks DA (2010) 'Lysosomal Storage Disease: Revealing Lysosomal Function and Physiology', *Physiology*, 25(2):102–115.
- Parnetti L, Paciotti S, Eusebi P, Dardis A, Zampieri S, Chiasserini D, Tasegian A, Tambasco N, Bembi B, Calabresi P, Beccari T (2017) 'Cerebrospinal fluid β -glucocerebrosidase activity is reduced in parkinson's disease patients', *Mov Disord*, 32(10):1423–1431.
- Pattison JS, Osinska H and Robbins J (2011) 'Atg7 Induces Basal Autophagy and Rescues Autophagic Deficiency in CryABR120G Cardiomyocytes', *Circ Res*, 109(2), pp. 151–160.

Perier C, Bové J, Dehay B, Jackson-Lewis V, Rabinovitch PS, Przedborski S, Vila M (2010) 'Apoptosis-inducing factor deficiency sensitizes dopaminergic neurons to parkinsonian neurotoxins', *Ann Neurol*, 68(2):184–192.

Perier C, Bender A, García-Arumí E, Melià MJ, Bové J, Laub C, Klopstock T, Elstner M, Mounsey RB, Teismann P, Prolla T, Andreu AL, Vila M (2013) 'Accumulation of mitochondrial DNA deletions within dopaminergic neurons triggers neuroprotective mechanisms', *Brain*, 136(8):2369–2378.

Piccoli C, Sardanelli A, Scrima R, . . . , Papa S (2008) 'Mitochondrial respiratory dysfunction in familiar Parkinsonism associated with PINK1 mutation', *Neurochem Res*, 33(12):2565–2574.

Pickrell AM and Youle RJ (2015) 'The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson's disease', *Neuron*, 85(2):257–273.

Pissadaki EK and Bolam JP (2013) 'The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease', *Front Comput Neurosci*, 7:13 doi: 10.3389/fncom.2013.00013.

Ploumi C, Daskalaki I and Tavernarakis N (2017) 'Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act', *FEBS J*, 284(2):183–195.

Polyzos AA and McMurray CT (2017) 'The chicken or the egg: mitochondrial dysfunction as a cause or consequence of toxicity in Huntington's disease', *Mech Ageing Dev*, 161:181–197.

Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ (2008) 'The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(5):1638–1643.

Poole AC, Thomas RE, Yu S, Vincow ES, Pallanck L (2010) 'The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway', *PLoS ONE*, 5(4): e10054 doi: 10.1371/journal.pone.0010054.

Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, . . . , Kubisch C (2006) 'Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase', *Nat Genet*, 38(10):1184–1191.

Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T, Saftig P (2007) 'LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase', *Cell*, 131(4):770–783.

Reddy K, Cusack CL, Nnah IC, Khayati K, Saqcena C, Huynh TB, Noggle SA, Ballabio A, Dobrowolski R (2016) 'Dysregulation of Nutrient Sensing and CLEARance in Presenilin Deficiency', *Cell Rep*, 14(9):2166–2179.

Redza-Dutordoir M and Averill-Bates DA (2016) 'Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species', *Biochim Biophys Acta*, 1863(12):2977–2992.

Remondelli P and Renna M (2017) 'The Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Disorders and Its Potential Therapeutic Significance', *Front Mol Neurosci*, 10:187 doi: 10.3389/fnmol.2017.00187.

- Ren YH, Niu XY, Huang HJ, Hao XD, Wang PX, Chi YL, Ding YQ, Liao M (2018) 'Dopamine neuron loss by selective deletion of autophagy-related gene 5 is not exacerbated by MPTP toxicity in midbrain', *Neuroscience Lett*, 675:140–144.
- Ribas V, García-Ruiz C and Fernández-Checa JC (2014) 'Glutathione and mitochondria', *Front Pharmacol*, 5:151 doi: 10.3389/fphar.2014.00151.
- Rocha EM, De Miranda B and Sanders LH (2018) 'Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease', *Neurobiol Dis*, 109:249–257.
- Rodríguez-Navarro JA, Rodríguez L, Casarejos MJ, Solano RM, Gómez A, Perucho J, Cuervo AM, García de Yébenes J, Mena MA (2010) 'Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation', *Neurobiol Dis*, 39(3), pp. 423–438.
- Ron I and Horowitz M (2005) 'ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity', *Hum Mol Genet*, 14(16):2387–2398.
- Ron I and Horowitz M (2008) 'Intracellular cholesterol modifies the ERAD of glucocerebrosidase in Gaucher disease patients', *Mol Genet Metab*, 93(4):426–436.
- Rothaug M, Zunke F, Mazzulli JR, Schweizer M, Altmepfen H, Lüllmann-Rauch R, Kallemijn WW, Gaspar P, Aerts JM, Glatzel M, Saftig P, Krainc D, Schwake M, Blanz J (2014) 'LIMP-2 expression is critical for β -glucocerebrosidase activity and α -synuclein clearance', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(43):15573–15578.
- Salvioli R, Scarpa S, Ciaffoni F, Tatti M, Ramoni C, Vanier MT, Vaccaro AM (2004) 'Glucosylceramidase Mass and Subcellular Localization Are Modulated by Cholesterol in Niemann-Pick Disease Type C', *J Biol Chem*, 279(17):17674–17680.
- Sanchez-Martinez A, Beavan M, Gegg ME, Chau KY, Whitworth AJ, Schapira AH (2016) 'Parkinson disease-linked GBA mutation effects reversed by molecular chaperones in human cell and fly models', *Sci Rep*, 6:31380 doi: 10.1038/srep31380.
- Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, . . . , Ballabio A (2009) 'A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function', *Science*, 325(5939):473–477.
- Sarkar P, Chakraborty H and Chattopadhyay A (2017) 'Differential Membrane Dipolar Orientation Induced by Acute and Chronic Cholesterol Depletion', *Sci Rep*, 7(1):4484 doi: 10.1038/s41598-017-04769-4.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) 'Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease', *J Neurochem*, 54(3):823–827.
- Schapira AH and Jenner P (2011) 'Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease', *Mov Disord*, 26(6):1049–1055.
- Schapira AH and Tolosa E (2010) 'Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: implications for treatment', *Nat Rev Neurol*, (6):309–17.
- Schapira AH (2015) 'Glucocerebrosidase and Parkinson disease: Recent advances', *Mol Cell Neurosci*, 66:37–42.

- Schöndorf DC, Ivanyuk D, Baden P, . . . , Deleidi M (2018) 'The NAD⁺ Precursor Nicotinamide Riboside Rescues Mitochondrial Defects and Neuronal Loss in iPSC and Fly Models of Parkinson's Disease', *Cell Rep*, 23(10):2976–2988.
- Schöndorf DC, Aureli M, McAllister FE, . . . , Deleidi M (2014) 'iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis', *Nat Commun*, 5:4028 doi: 10.1038/ncomms5028.
- Schulte C and Gasser T (2011) 'Genetic basis of Parkinson's disease: Inheritance, penetrance, and expression', *Appl Clin Genet*, 4:67–80.
- Sedlackova L and Korolchuk VI (2018) 'Mitochondrial quality control as a key determinant of cell survival', *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866(4):575–587.
- Senft D and Ronai ZA (2015) 'UPR, autophagy and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response', *Trends Biochem Sci*, 40(3):141–148.
- Setó-Salvia N, Pagonabarraga J, Houlden H, . . . , Clarimón J (2012) 'Glucocerebrosidase mutations confer a greater risk of dementia during Parkinson's disease course', *Mov Disords*, 27(3):393–399.
- Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A (2013) 'Signals for the lysosome: a control center for cellular clearance and energy metabolism', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(5):283–296.
- Settembre C and Ballabio A (2011) 'TFEB regulates autophagy: An integrated coordination of cellular degradation and recycling processes', *Autophagy*, 7(11):1379–1381.
- Shaheen A (2018) 'Effect of the unfolded protein response on ER protein export: a potential new mechanism to relieve ER stress', *Cell Stress Chaperones*, 23(5):797–806.
- Shi SY, Lu SY, Sivasubramaniyam T, . . . , Woo M (2015) 'DJ-1 links muscle ROS production with metabolic reprogramming and systemic energy homeostasis in mice', *Nature Commun*, 6:7415 doi: 10.1038/ncomms8415.
- Shi Y (2002) 'Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis', *Mol Cell*, 9(3):459–470.
- Shimizu S (2018) 'Biological Roles of Alternative Autophagy', *Mol Cells*, 41(1):50–54.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, . . . , Ziegler SG (2009) 'Multi-Center Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease', *N Engl J Med*, 361(17):1651–1661.
- Sidransky E and Lopez G (2012) 'The link between the GBA gene and parkinsonism', *The Lancet Neurol*, 11(11):986–998.
- Siebert M, Sidransky E and Westbroek W (2014) 'Glucocerebrosidase is shaking up the synucleinopathies', *Brain*, 137(5):1304–1322.
- Sillence DJ, Puri V, Marks DL, Butters TD, Dwek RA, Pagano RE, Platt FM (2002) 'Glucosylceramide modulates membrane traffic along the endocytic pathway', *J Lipid Res* 43(11):1837–1845.

Smith GA, Jansson J, Rocha EM, Osborn T, Hallett PJ, Isacson O (2016) 'Fibroblast Biomarkers of Sporadic Parkinson's Disease and LRRK2 Kinase Inhibition', *Mol Neurobiol*, 53(8):5161–5177.

Smith L, Mullin S and Schapira AH (2017) 'Insights into the structural biology of Gaucher disease', *Exp Neurol*, 298:180–190.

Song S, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q (2017) 'Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress', *J Cell Physiol*, 232(11):2977–2984.

Stefanoni G, Sala G, Tremolizzo L, Brighina L, Ferrarese C (2011). Alpha-synuclein, oxidative stress and autophagy failure: dangerous liaisons in dopaminergic neurodegeneration. In Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease. InTech.

Stojkowska I, Krainc D and Mazzulli JR (2017) 'Molecular mechanisms of α -synuclein and GBA1 in Parkinson's disease', *Cell Tissue Res*, 373(1):51-60.

Suárez-Rivero JM, Villanueva-Paz M, de la Cruz-Ojeda P, de la Mata M, Cotán D, Oropesa-Ávila M, de Laveria I, Álvarez-Córdoba M, Luzón-Hidalgo R, Sánchez-Alcázar JA (2016) 'Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases', *Diseases*, 5(1) doi: 10.3390/diseases5010001.

Szeto, HH (2006) 'Cell-permeable, Mitochondrial-targeted, Peptide Antioxidants', *AAPS J.*, 8(2):E277-83.

Takahashi Y, Nada S, Mori S, Soma-Nagae T, Oneyama C, Okada M. (2012) 'The late endosome/lysosome-anchored p18-mTORC1 pathway controls terminal maturation of lysosomes', *Biochem Biophys Res Commun*, 417(4):1151–1157.

Tamargo RJ, Velayati A, Goldin E, Sidransky E (2012) 'The role of saposin C in Gaucher disease', *Mol Genet Metab*, 106(3):257–263.

Tanner CM, Kamel F, Ross GW, . . . , Langston JW (2011) 'Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease', *Environ Health Perspect*, 119(6):866–872.

Teves JMY, Bhargava V, Kirwan KR, . . . , Madhavan L (2018) 'Parkinson's disease skin fibroblasts display signature alterations in growth, redox homeostasis, mitochondrial function, and autophagy', *Front Neurosci*, 11:737 doi: 10.3389/fnins.2017.00737.

Tsunemi T and La Spada AR (2012) 'PGC-1 α at the intersection of bioenergetics regulation and neuron function: from Huntington's disease to Parkinson's disease and beyond', *Prog Neurobiol*, 97(2):142–151.

Turpin JC. et al. (1987) Parkinsonian symptomatology in a patient with type I (adult) Gaucher's disease. In Lipid Storage Disorders, Biological and Medical Aspects (Salvayre R, Douste-Blazyl L & Gatt S, eds), pp. 103–104. Plenum Press, New York, NY.

Vaccaro AM, Motta M, Tatti M, Scarpa S, Masuelli L, Bhat M, Vanier MT, Tylki-Szymanska A, Salvioli R (2010) 'Saposin C mutations in Gaucher disease patients resulting in lysosomal lipid accumulation, saposin C deficiency, but normal prosaposin processing and sorting', *Hum Mol Genet*, 19(15):2987–2997.

- Valente AJ, Maddalena LA, Robb EL, Moradi F, Stuart JA. (2017) 'A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture', *Acta Histochem*, 119(3):315–326.
- Vitale A and Pedrazzini E (2017) 'Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus: Old friends, novel intimate relationships', *J Exp Bot*, 68(13):3283–3285.
- Wang B, Abraham N, Gao G, Yang Q (2016) 'Dysregulation of autophagy and mitochondrial function in Parkinson's disease', *Transl Neurodegener*, 5:19 doi: 10.1186/s40035-016-0065-1.
- Wang HL, Chou AH, Wu AS, Chen SY, Weng YH, Kao YC, Yeh TH, Chu PJ, Lu CS (2011) 'PARK6 PINK1 mutants are defective in maintaining mitochondrial membrane potential and inhibiting ROS formation of substantia nigra dopaminergic neurons', *Biochim Biophys Acta*, 1812(6):674–684.
- Wang X, Petrie TG, Liu Y, Liu J, Fujioka H, Zhu X (2012) 'Parkinson's disease-associated DJ-1 mutations impair mitochondrial dynamics and cause mitochondrial dysfunction', *J Neurochem*, 121(5):830–839.
- Wei H, Kim SJ, Zhang Z, Tsai PC, Wisniewski KE, Mukherjee AB (2008) 'ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones', *Hum Mol Genet*, 17(4):469–477.
- Westbroek W, Gustafson AM, Sidransky E (2011) 'Exploring the link between glucocerebrosidase mutations and parkinsonism', *Trends Mol Med*, 17(9):485–493.
- Wilson TJ, Slupe AM, Strack S (2013) 'Cell signaling and mitochondrial dynamics: Implications for neuronal function and neurodegenerative disease', *Neurobiol Dis*, 51:13–26.
- Wong E and Cuervo AM (2010) 'Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases', *Nat Neurosci*, 13(7):805–811.
- Woodard CM, Campos BA, Kuo SH, . . . , Noggle SA (2014) 'iPS Cell-derived Dopamine Neurons Reveal Differences between Monozygotic Twins Discordant for Parkinson's Disease', *Cell Rep*, 9(4):1173–1182.
- Xie Z and Klionsky DJ (2007) 'Autophagosome formation: Core machinery and adaptations', *Nat Cell Biol*, 9(10):102–1109.
- Xu YH, Xu K, Sun Y, Liou B, Quinn B, Li RH, Xue L, Zhang W, Setchell KD, Witte D, Grabowski GA (2014) 'Multiple pathogenic proteins implicated in neuronopathic Gaucher disease mice', *Hum Mol Genet*, 23(15):3943–3957.
- Yakhine-Diop SMS, Niso-Santano M, Rodríguez-Arribas M, . . . , Fuentes JM (2018) 'Impaired Mitophagy and Protein Acetylation Levels in Fibroblasts from Parkinson's Disease Patients', *Mol Neurobiol*, doi: 10.1007/s12035-018-1206-6.
- Yamamoto A and Simonsen A (2011) 'The elimination of accumulated and aggregated proteins: A role for aggrephagy in neurodegeneration' *Neurobiol Dis*, 43(1):17–28.

Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang JW, Yang L, Beal MF, Vogel H, Lu B. (2006) 'Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(28):10793–10798.

Yang Z and Klionsky DJ (2010) 'Eaten alive: a history of macroautophagy', *Nat Cell Biol*, 12(9):814–822.

Yun SP, Kim D, Kim S, . . . , Ko HS (2018) ' α -Synuclein accumulation and GBA deficiency due to L444P GBA mutation contributes to MPTP-induced parkinsonism', *Mol Neurodegener*, 13(1):1 doi: 10.1186/s13024-017-0233-5.

Anexo